

Untersuchungen zur Funktion und Regulation des
seneszenzassoziierten *HvS40*-Genes der Gerste
(*Hordeum vulgare* L.) und *HvS40* verwandter Gene
von *Arabidopsis thaliana*

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel



vorgelegt von
Isabell Kilbienski

Kiel
2007

Referent/in:.....Prof. Dr. K. Krupinska

Koreferent/in:.....Prof. Dr. D. Ober

Tag der mündlichen Prüfung:.....6. Dezember 2007

Zum Druck genehmigt:.....12. Dezember 2007

Kiel, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung	1
-----------------	---

Summary	2
---------	---

1	Einleitung	3
---	------------	---

1.1	Aspekte der Blattseneszenz	3
-----	----------------------------	---

1.2	Regulation der Blattseneszenz	5
-----	-------------------------------	---

1.2.1	Phytohormone	6
-------	--------------	---

1.2.2	Pathogenbefall	8
-------	----------------	---

1.3	Regulatorische Gene der Blattseneszenz	8
-----	--	---

1.4	Das <i>HvS40</i> -Gen	10
-----	-----------------------	----

1.5	Zielsetzung	13
-----	-------------	----

2	Material und Methoden	14
---	-----------------------	----

2.1	Chemikalien und Enzyme	14
-----	------------------------	----

2.2	Pflanzenmaterial	14
-----	------------------	----

2.2.1	Anzucht von <i>A. thaliana</i>	14
-------	--------------------------------	----

2.2.2	Blattmaterial für die Analyse der Seneszenz von <i>A. thaliana</i>	15
-------	--	----

2.2.3	Behandlung von <i>A. thaliana</i> mit Phytohormonen und Pathogenen	15
-------	--	----

2.2.4	Anzucht und Ernte der T-DNA-Insertionslinien	16
-------	--	----

2.2.5	Selektion der Pflanzen über das Herbizid BASTA	17
-------	--	----

2.2.6	Anzucht und Ernte von Gerste	17
-------	------------------------------	----

2.3	Oligonukleotide	17
-----	-----------------	----

2.4	Herstellung der Transformationsvektoren	21
-----	---	----

2.5	Allgemeine molekularbiologische Methoden	25
-----	--	----

2.5.1	Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien	25
-------	--	----

2.5.1.1	Anzucht und Lagerung	25
---------	----------------------	----

2.5.1.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
---------	--	----

2.5.1.3	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	26
---------	--	----

2.5.2	Isolierung von Plasmiden	27
-------	--------------------------	----

2.5.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	28
-------	-------------------------------	----

2.5.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	28
2.5.3.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.5.4	Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten.....	29
2.5.5	Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial.....	29
2.5.5.1	Isolierung genomischer DNA.....	29
2.5.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit Boratpuffer.....	30
2.5.5.3	Isolierung von Gesamt-RNA mit Trifast-Reagenz.....	31
2.5.6	Synthese von cDNA.....	31
2.5.7	Phenolextraktion	32
2.5.8	Fällung von Nukleinsäuren.....	32
2.5.9	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	32
2.6	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen.....	33
2.6.1	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	33
2.6.2	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.....	33
2.6.3	Native Polyacrylamidgelelektrophorese.....	34
2.6.4	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	35
2.6.5	Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen.....	36
2.6.6	Trocknung von Proteingelen.....	36
2.7	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	36
2.7.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	36
2.7.2	Phosphorylierung von Oligonukleotiden.....	37
2.8	Immobilisierung von Makromolekülen auf Membranen.....	37
2.8.1	Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen.....	37
2.8.2	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen.....	38
2.9	Hybridisierung immobilisierter RNA mit DNA-Sonden.....	38
2.10	Extraktion von Proteinen.....	39
2.10.1	Überexpression und Isolierung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
2.10.2	Isolierung von Gesamtproteinen aus Pflanzenmaterial.....	40
2.10.3	Isolierung von Kernproteinen.....	40
2.10.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
2.11	Proteinanalyse.....	42
2.11.1	Phosphorylierungsanalyse von Proteinen.....	42
2.11.2	DNA-Protein-Bindereaktion.....	42
2.11.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	43
2.12	Transformation von Pflanzen.....	44
2.12.1	Biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen.....	44
2.12.2	Transformation von Gerste.....	45
2.12.3	Transformation von <i>A. thaliana</i>	45

2.12.4	Transformation von Kartoffelprotoplasten.....	46
2.12.4.1	Isolierung von Protoplasten aus Kartoffelblättern.....	46
2.12.4.2	Transformation von Kartoffelprotoplasten mittels PEG.....	47
2.13	Färbemethoden.....	48
2.13.1	GUS-Färbung.....	48
2.13.2	Färbung von Mitochondrien.....	48
2.14	Datenbanken.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Charakterisierung des HvS40-Proteins.....	50
3.1.1	Analyse der Aminosäuresequenz.....	50
3.1.2	Subzelluläre Lokalisation des HvS40-Proteins.....	52
3.1.3	Phosphorylierung des HvS40-Proteins.....	52
3.1.4	Homologien zu Proteinen der DUF584-Familie.....	53
3.2	Überexpression des <i>HvS40</i>-Gens in Gerste.....	56
3.3	Überexpression des <i>HvS40</i>-Gens in <i>A. thaliana</i>.....	60
3.3.1	Nachweis des <i>HvS40</i> -Transkriptes in den Überexpressionslinien von <i>A. thaliana</i>	61
3.3.2	Immunologischer Nachweis des HvS40-Proteins in der <i>p35S::HvS40-HA/2</i> -Linie.....	63
3.4	Untersuchungen zur Expression der DUF584-Gene aus <i>A. thaliana</i>.....	65
3.4.1	Altersbedingte Seneszenz.....	65
3.4.2	Stressabhängige Expression.....	68
3.4.2.1	Dunkelinduzierte Seneszenz.....	68
3.4.2.2	Inkubationen mit Phytohormonen.....	69
3.4.2.3	Pathogeninfektion.....	71
3.4.3	Tabellarische Zusammenfassung der Expression der DUF584-Gene.....	73
3.4.4	Subzelluläre Lokalisation der AtS40-Proteine.....	74
3.5	Analyse von T-DNA-Insertionslinien des <i>AtS40-3</i>-Gens.....	76
3.5.1	Analyse des Phänotyps im Verlauf der Seneszenz.....	78
3.5.2	Expression des <i>AtS40-3</i> -Gens in den Insertionslinien.....	80
3.6	Regulation der Expression des <i>HvS40</i>-Gens.....	81
3.6.1	Promotoranalyse des <i>HvS40</i> -Gens.....	81
3.6.2	Bindung des HvWhy1-Proteins an Nukleinsäuren.....	84

3.7	Charakterisierung der Whirly-Proteine	87
3.7.1	Lokalisation der Whirly-Proteine aus <i>A. thaliana</i>	89
3.7.2	Lokalisation der Whirly1-Proteine nach Entfernung der plastidären Importsequenz	92
4	Diskussion	94
4.1	Funktion des HvS40-Proteins	94
4.1.1	Charakterisierung des HvS40-Proteins	94
4.1.2	Überexpression des <i>HvS40</i> -Gens in Gerste und <i>A. thaliana</i>	97
4.2	<i>HvS40</i> verwandte Gene in <i>A. thaliana</i>	98
4.2.1	Expression <i>HvS40</i> verwandter Gene	98
4.2.2	Subzelluläre Lokalisation HvS40 verwandter Proteine	100
4.2.3	Analyse der T-DNA-Insertionslinien des <i>AtS40-3</i> -Gens	101
4.3	Regulation der Expression des <i>HvS40</i>-Gens	102
4.3.1	Regulatorische <i>cis</i> -Elemente des <i>HvS40</i> -Promotors	102
4.3.2	Whirly1 als Transkriptionsfaktor des <i>HvS40</i> -Promotors	103
4.4	Whirly1 als Regulator der Telomerase	105
4.5	Subzelluläre Lokalisation der Whirly-Proteine aus <i>A. thaliana</i>	105
	Literaturverzeichnis	108
A	Anhang	117

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CaMV	„Cauliflower Mosaic Virus“
cDNA	kompletäre DNA
cfu	koloniebildende Einheit („colony forming unit“)
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Lumineszenz („enhanced chemiluminescence“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
HA	Hemagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyl)-1-Piperizin-Ethansulfonsäure
HR	hypersensitive Reaktion
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Murashige und Skoog Medium
OD	optische Dichte
PPFD	photosynthetische Photonenflussdichte
PR	„pathogenesis related“
psi	Druckeinheit (Pfund pro Quadratzoll)
RT	Raumtemperatur
SAG	seneszenzassoziiertes Gen („senescence associated gene“)
SAR	systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Enzymeinheit („units“)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-GlcA	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glycuronsäure

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion und Regulation des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens der Gerste analysiert. Das *HvS40*-Protein verfügt über zwei Kernlokalisierungssignale, eine Kernexportsequenz sowie über eine PEST-Sequenz, die für regulatorische Proteine mit kurzer Halbwertszeit charakteristisch ist. Mit Hilfe einer GFP-Fusion konnte durch die transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen die Lokalisation des *HvS40*-Proteins im Zellkern bestätigt werden. Des Weiteren wurde in einem experimentellen Ansatz gezeigt, dass das Protein phosphorylierbar ist. Aufgrund dieser Befunde könnte das *HvS40*-Protein eine regulatorische Funktion als ‚Shuttle‘-Protein besitzen. Zur Analyse der Funktion des Proteins wurde das *HvS40*-Gen sowohl in Gerste als auch in *A. thaliana* überexprimiert. Es wurden transgene Linien erzeugt, in denen das *HvS40*-Transkript nachgewiesen werden konnte. Ein immunologischer Nachweis des *HvS40*-Proteins konnte trotz einer erhöhten Transkriptmenge in diesen Linien nicht erbracht werden.

Das *HvS40*-Protein der Gerste gehört zu den Proteinen der DUF584-Familie. Um ein zum *HvS40*-Gen der Gerste funktionell vergleichbares Gen zu finden, wurde die Expression von 15 Genen dieser Familie aus *A. thaliana* im Vergleich zur Expression des *HvS40*-Gens untersucht. Unter den 15 Genen konnten 7 Gene ermittelt werden, die eine Transkriptakkumulation während der altersbedingten Seneszenz zeigten. Unter diesen wurden vier Gene identifiziert, die auch während der dunkelinduzierten Seneszenz eine erhöhte Transkriptmenge aufwiesen. Bei drei dieser Gene konnte eine Erhöhung der Expression nach Zugabe von Abscisinsäure und Salicylsäure sowie nach Infektion mit dem Pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 festgestellt werden. Für eines dieser Gene aus *A. thaliana* wurde in Fusion mit GUS in transienten Transformationsansätzen eine Akkumulation des zugehörigen Proteins im Zellkern nachgewiesen. Linien von *A. thaliana* mit einer T-DNA-Insertion im Promotorbereich dieses Gens zeigen eine verzögerte Seneszenz. Unter der Annahme, dass das Protein in *A. thaliana* funktionell zum *HvS40* vergleichbar ist, unterstützt dies die Hypothese, dass das *HvS40* ein Regulator der Seneszenz ist.

Es konnte gezeigt werden, dass der Promotorbereich des *HvS40*-Gens über *cis*-Elemente verfügt, die an der Regulation der Expression des Gens während der Seneszenz, dem Pathogenbefall und unter Einfluss der Hormone Abscisinsäure, Methyljasmonat und Salicylsäure beteiligt sein können. Weiterhin verfügt der Promotor über zwei Motive, die dem ERE-Element des *PR10a*-Gens der Kartoffel ähneln, an die Transkriptionsfaktoren der Whirly-Familie binden können. Durch Gelretardierungsexperimente mit dem HvWhy1-Protein wurde gezeigt, dass das HvWhy1-Protein im Zellkern sowohl an die zwei Motive des *HvS40*-Promotors als auch an einzelsträngige Telomersequenzen binden kann. Überraschenderweise konnten GFP-Fusionsproteine von AtWhy1 und AtWhy3 in den Plastiden nachgewiesen werden, während das AtWhy2-Protein eine mitochondriale Lokalisation aufweist. Dadurch ist anzunehmen, dass das Why1-Protein noch eine zusätzliche Funktion in den Plastiden besitzen könnte oder vor seiner Funktion im Kern in den Plastiden gespeichert wird.

Summary

In the present study, the function and the regulation of the senescence associated *HvS40* gene of barley was analyzed. The *HvS40* protein includes two nuclear localization signals, a nuclear export signal and a hypothetical PEST-sequence characteristic for regulatory proteins of a short life span. By transient transformation of onion epidermal cells it was shown that the protein is localized in the nucleus. Furthermore, an experimental approach showed that the protein can be phosphorylated. These findings support the hypothesis that the *HvS40* protein has a regulatory function as a shuttle protein. To study the function of the protein, the *HvS40* gene was overexpressed in barley and *A. thaliana*. It was possible to isolate transgenic lines accumulating the transcript of the *HvS40* gene; nevertheless it was not possible to detect the protein using immunological methods.

The *HvS40* protein of barley belongs to the DUF584-family. To identify a gene in *A. thaliana* functionally related to the *HvS40* gene the transcript accumulation of 15 genes of the DUF584-family of *A. thaliana* was analyzed in comparison to expression of the *HvS40* gene. It could be shown that 7 of the 15 genes were upregulated during natural senescence. Among these genes four also showed a transcript accumulation during dark induced senescence. Three of these genes were also upregulated by treatment with abscisic acid, salicylate and after infection with *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. By transient transformation it could be shown that one of the corresponding proteins fused to GUS accumulates in the nucleus. Interestingly, lines of *A. thaliana* with a T-DNA insertion in the promoter region of this gene showed a delayed senescence phenotype. Considering that this protein in *A. thaliana* has the same function as the *HvS40* protein in barley, the function as a regulator of senescence could be proposed for *HvS40*.

The *HvS40* promoter region was analyzed for *cis*-elements possibly involved in the regulation of the gene. There are some elements which confirm the upregulation of the gene during senescence, pathogen infection and treatment with phytohormones such as abscisic acid, methyl-jasmonate and salicylate. Interestingly, the promoter has two *cis*-elements which are similar to the ERE-element of the *PR10a*-promoter of potato, known to bind to proteins of the Whirly transcription factor family. It could be shown that the *HvWhy1* protein is able to bind to the two motives of the *HvS40* promoter and also to single-stranded telomere sequences.

Unexpectedly, GFP fusions of *AtWhy1* and *AtWhy3* were localized in the plastids, while an *AtWhy2*-GFP fusion protein was localized in the mitochondria. This suggests that *Why1* either has an additional function in the plastids or is stored in plastids before having functions in the nucleus.

1 Einleitung

1.1 Aspekte der Blattseneszenz

Die Seneszenz ist eine komplexe, hoch regulierte Phase in der Entwicklung einer Pflanze, die zum Absterben von einzelnen Organen oder der ganzen Pflanze führen kann. Sie dient dem Abbau von Makromolekülen zur Remobilisierung von Nährstoffen, die in andere Organe der Pflanze transportiert werden. Prinzipiell können im Pflanzenreich zwei Seneszenzformen unterschieden werden. In der monokarpischen Seneszenz geht das Absterben der Pflanze einher mit der reproduktiven Phase. Die remobilisierten Nährstoffe werden dabei für den Aufbau der Samen verwendet. Dies macht bei einjährigen Pflanzen, wie der Gerste, den größten Anteil der Kornfüllung aus (Feller und Kleist 1986). Die polykarpische Seneszenz ist charakteristisch für mehrjährige Pflanzen, bei denen nur einzelne Organe absterben. Dieses Phänomen ist jährlich bei der herbstlichen Laubfärbung zu beobachten. Die remobilisierten Assimilate werden in die überdauernden Organe transportiert und dort bis zur nächsten Vegetationsperiode eingelagert. Die Seneszenz lässt sich in drei Phasen einteilen (Yoshida 2003). Sie beginnt mit der Initiationsphase, die durch exogene oder endogene Faktoren ausgelöst werden kann. In der degenerativen Phase kommt es zum Abbau der Makromoleküle und zellulärer Komponenten. Die terminale Phase ist gekennzeichnet durch einen Verlust der Zellintegrität und Zelltod (Dangl 2000).

In den seneszierenden Organen, insbesondere dem Blatt als Ort des größten Stoffumsatzes, finden während der Seneszenz enorme Veränderungen auf struktureller und biochemischer Ebene statt. Es kommt zum Abbau von Ribonukleinsäuren, Lipiden, Proteinen und Chlorophyllen (Gan und Amasino 1997, Thompson *et al.* 1998, He und Gan 2001). Derartige Veränderungen erfolgen vor allem in den Chloroplasten als Kompartiment mit dem größten Proteingehalt der Zelle (Krupinska und Humbeck 2003). Der erste sichtbare Effekt der Blattseneszenz ist die Abnahme des Chlorophyllgehalts. Der Abbau des Chlorophylls dient der Freisetzung der Chlorophyllbindeproteine und dem Schutz vor photooxidativer Schädigung (Matile und Hörtensteiner 1999). Die aus dem Chlorophyllabbau entstehenden Endprodukte werden in die Vakuole eingelagert (Hörtensteiner 1999). Die Chlorophyllbindeproteine dienen zusammen mit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCo) der Remobilisierung von Stickstoff. Aus den Chloroplasten werden ca. 75 % des remobilisierten Stickstoffs gewonnen, wobei der größte Anteil von der RuBisCo stammt, die mit ca. 70 % das größte Stickstoffreservoir der Zelle darstellt. Die Blattseneszenz kann entsprechend der Abnahme des Chlorophyllgehalts in mehrere Stadien eingeteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nach Otegui *et al.*

(2005) verwendete Einteilung in 4 Gruppen vorgenommen, von NS (nicht seneszent), zu S1 (30-50 % Chlorophyllverlust), über S2 (50 - 75 % Chlorophyllverlust) zu S3 (>75 % Chlorophyllverlust). Weitere Veränderungen in den Chloroplasten sind die Umstrukturierung von Grana- und Stromathylakoiden, sowie die Bildung von Plastoglobuli (Smart 1994), die einhergeht mit dem Abbau der Thylakoide (del Rio *et al.* 1998). Im Gegensatz zum frühen Verlust der Chloroplastenintegrität bleiben der Zellkern und die Mitochondrien bis zu einem späten Stadium der Seneszenz intakt. Der Erhalt des Zellkerns ist essentiell für die chloroplastidäre Seneszenz, da sie unter direkter Kontrolle des Zellkerns steht (Gan und Amasino 1997). Die Mitochondrien sorgen für die notwendige Energie, die für die Mobilisierung von Zellbestandteilen erforderlich ist (Thomson und Plat-Aloia 1987). In einer späten Phase der Seneszenz finden Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und ein kontrollierter Zusammenbruch der Vakuole statt. Diese Veränderungen sind Bestandteil des programmierten Zelltods, der letztendlich zum Verlust der Integrität der Plasmamembran und damit zum Tod der Zelle führt (Yen und Yang 1998, Cao *et al.* 2003).

Die strukturellen und biochemischen Veränderungen während der Seneszenz wurden überwiegend an Kulturpflanzen wie der Gerste untersucht. In den letzten Jahren wurde die Blattseneszenz vermehrt an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) analysiert. Mit ihrem relativ kleinen Genom, das vollständig sequenziert wurde (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), sowie ihrem kurzen Lebenszyklus bietet *A. thaliana* eine gute genomische Ressource zur Identifizierung und funktionellen Analyse von seneszenzassoziierten Genen. Die Wachstumsstadien von *A. thaliana* sind mittlerweile detailliert definiert worden (Boyes *et al.* 2001). Damit ist eine gute Grundlage zur Vergleichbarkeit von Ergebnissen geschaffen. Allerdings ist *A. thaliana* eigentlich keine ideale Pflanze zur Untersuchung der Seneszenz, denn die Blätter haben eine nur sehr kurze Lebenszeit. Die Blattseneszenz in *A. thaliana* ist ein sehr schneller Prozess, der kaum durch die reproduktive Phase der Pflanze kontrolliert wird (Noodén und Penney 2001). Da alle normalen Seneszenzprozesse, wie z.B. der Abbau der Makromoleküle und die Mobilisierung von Nährstoffen, auch in *A. thaliana* stattfinden (Himmelblau und Amasino 2001), wird die Pflanze zur Untersuchung des Seneszenzprozesses herangezogen. Diverse Banken von T-DNA-Insertionslinien bieten die Möglichkeit der funktionellen Analyse einzelner Gene. Ein weiterer Vorteil, den *A. thaliana* hat, ist die Herstellung transgener Pflanzen. Damit ist es möglich, den Einfluss einer Überexpression, einer Repression (RNA-Interferenz) oder einer induzierten Expression eines seneszenzassoziierten Gens zu untersuchen.

1.2 Regulation der Blattseneszenz

Der Seneszenzprozess wird von internen und externen Faktoren beeinflusst. Zu den internen Faktoren, die die Blattseneszenz fördern, zählen diverse Phytohormone, das Alter der Pflanze, sowie die Entwicklung reproduktiver Organe (Noodén 1988). Als externe Faktoren können Trockenheit, Nährstoffmangel, Pathogenbefall, Ozon, sowie extreme Temperatur- und Lichtverhältnisse fördernd wirken (Thomas und Stoddart 1980). Als ein Modellsystem zur Untersuchung seneszenzassoziierter Gene wurde in den vergangenen Jahren häufig die dunkelinduzierte Seneszenz verwendet (Becker und Apel 1993, Kleber-Janke und Krupinska 1997). Durch die Dunkelinkubation von Blättern oder Pflanzen werden Seneszenzprozesse ausgelöst, die aber nur partiell mit denen der natürlichen Seneszenz übereinstimmen (Oh *et al.* 1996, Weaver und Amasino 2001).

Während der Seneszenz kommt es zu einem Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die durch ihre extrem hohe Reaktivität zur unkontrollierten Zerstörung von Makromolekülen und damit zur Schädigung der Zelle führen können (Dat *et al.* 2000, Zimmermann und Zentgraf 2005). Es gibt auch Hinweise, dass ROS nicht nur schädlich für die Zelle sind, sondern in geringen Konzentrationen auch als Signalsubstanzen wirken (Alvarez *et al.* 1998). So wurde bereits für das relativ stabile Wasserstoffperoxid gezeigt, dass es in geringen Konzentrationen die Expression von stressinduzierten Genen fördern kann (Ryals *et al.* 1996, Foyer *et al.* 1998).

Die Blattseneszenz ist ein fein regulierter Prozess, der durch viele Signalwege beeinflusst wird, die auf verschiedenste externe und interne Faktoren reagieren und verbunden sind zu einem komplexen regulatorischen Netzwerk (He *et al.* 2001, Lim *et al.* 2007). Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Modell zur Veranschaulichung des Netzwerkes von Signalwegen, die zur veränderten Genexpression während der Seneszenz führen (aus Buchanan-Wollaston *et al.* 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss einzelner Phytohormone und des Pathogenbefalls auf die Expression seneszenzassoziierter Gene untersucht. In den folgenden Abschnitten wird die Bedeutung dieser Faktoren näher erläutert, um einen Einblick in die komplexe Regulation der Blattseneszenz zu erhalten.

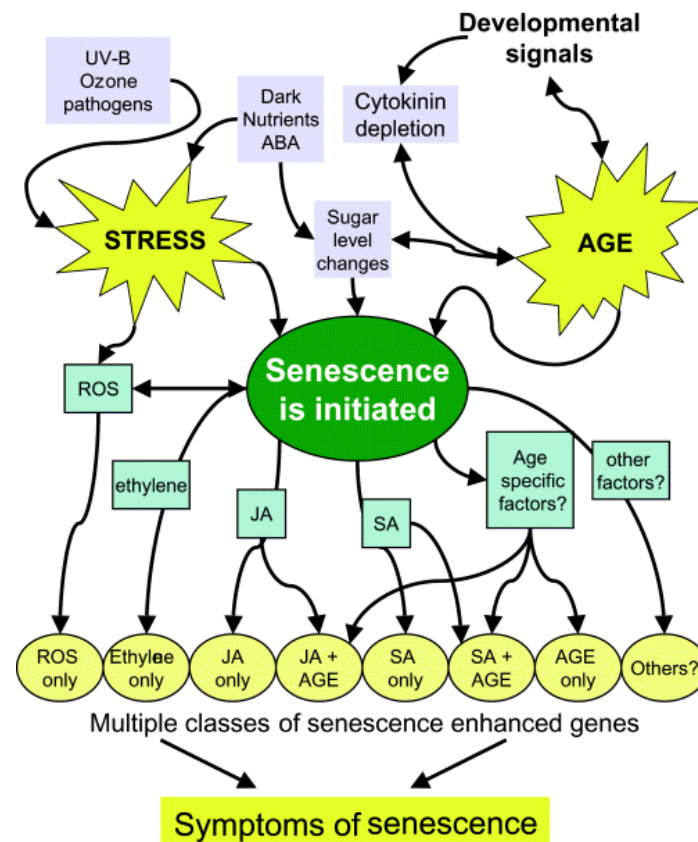


Abb. 1 Modell zur Illustration des komplexen Netzwerkes der Genregulation während der Blattseneszenz (aus Buchanan-Wollaston *et al.* 2003).

1.2.1 Phytohormone

Phytohormone beeinflussen Wachstum, Entwicklung und physiologische Prozesse einer Pflanze. Sie spielen aber auch bei der Antwort auf Stress eine Rolle. So wurde schon mehrfach berichtet, dass biotische und abiotische Stressbedingungen häufig zur Synthese bestimmter Phytohormone oder zur Aktivierung der Signalwege führt, die die Genexpression von stressassoziierten Genen regulieren (Lim *et al.* 2007). Im Blatt sind die Phytohormone in allen drei Phasen der Seneszenz von Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Phytohormone Abscisinsäure, Jasmonat und Salicylsäure verwendet. Im Folgenden wird die Rolle dieser Hormone als negative oder positive Regulatoren der Genexpression von seneszenzassoziierten Genen vorgestellt.

Abscisisäure (ABA) ist ein Hormon, das die Antworten auf Stress vermittelt und involviert ist in die Samenkeimung und Wachstum einer Pflanze. Trockenheit, Salzstress und niedrige Temperaturen führen ebenso wie die Blattseneszenz zu einem erhöhten Gehalt an ABA (Gepstein und Thimann 1980). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Schlüsselenzyme der ABA-Synthese während der Seneszenz eine erhöhte Expression zeigen (van der Graaff *et al.* 2006). Die exogene Applikation von ABA führt zu einer Akkumulation von Wasserstoffperoxid und damit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die während der Seneszenz verstärkt auftreten (Hung und Kao 2004). ABA induziert ebenfalls die Expression von antioxidativen Enzymen, wie der Superoxid-Dismutase, der Ascorbatperoxidase und der Katalase, die die reaktiven Sauerstoffspezies unschädlich machen und damit eine unkontrollierte Zerstörung der Zelle verhindern (Hung und Kao 2003).

Jasmonsäure (JA) ist ein Wachstumsregulator, der eine wichtige Rolle in der Antwort auf Verwundung und Pathogenbefall einnimmt (Turner *et al.* 2002) sowie an der Regulation der Blattseneszenz beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von JA in Gerstenblättern zu einer Abnahme im Chlorophyllgehalt und zu einer Reduktion der kleinen Untereinheit der RuBisCo führt (Parthier 1990). In *A. thaliana* verursacht die Zugabe von JA eine verfrühte Seneszenz (He *et al.* 2002), die in der *Co1-1*-Mutante von *A. thaliana*, die insensitive gegenüber JA ist, nicht auftritt (Xie *et al.* 1998). Jasmonat-insensitive Mutanten oder Mutanten mit reduziertem Jasmonsäuregehalt sind in ihrer Entwicklung jedoch nicht gestört (He *et al.* 2002). JA spielt eine Rolle während der Seneszenz, ist aber nicht essentiell für das Stattfinden des Prozesses.

Salicylsäure (SA) ist in die Antwort auf Pathogenbefall und den Pathogen-vermittelten Zelltod der Pflanze involviert. Eine wichtige Aufgabe besitzt SA ebenfalls in der altersabhängigen Blattseneszenz. Der Gehalt an Salicylsäure ist in seneszierenden Blättern um ein Vierfaches höher. Dies ist wichtig für die Regulation einiger SAGs ('senescence associated genes'), die während der Seneszenz verstärkt exprimiert werden (Morris *et al.* 2000). So ist die Expression der Gene *PR1a* ('pathogenesis related') und *SAG12* vom SA-vermittelten Signalweg abhängig. Mutanten von *A. thaliana*, die einen Defekt im SA-Signalweg oder im Biosyntheseweg besitzen (*npr1*, *pad4*), zeigen kaum eine nachweisbare Expression der SAGs. Es gibt Hinweise, dass SA eine Funktion im Prozess des seneszenzassoziierten Zelltods hat. Die *pad4*-Mutante, die einen Defekt im SA-Signalweg besitzt, scheint keinen normalen Zelltod zu durchlaufen, wie es im Wildtyp von *A. thaliana* zu beobachten ist (Morris *et al.* 2000). Die Blätter bleiben sehr lange gelb und zeigen einen stark verzögerten Zelltod (Rao und Davis 2002). Gene, deren Expression von SA abhängt scheinen nicht essentiell für den Verlauf der Seneszenz zu sein sondern spielen wahrscheinlich im Prozess des seneszenzassoziierten Zelltods eine Rolle (Buchanan-Wollaston *et al.* 2003).

1.2.2 Pathogenbefall

Eine häufige Reaktion der Pflanze auf Pathogenbefall ist die hypersensitive Reaktion. In der hypersensitiven Reaktion, die lokal an der Infektionsstelle stattfindet, kommt es zu physiologischen Veränderungen, wie z.B. der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies sowie der Produktion der Phytohormone Salicylsäure, Jasmonat und Ethylen (Hammond-Kosack *et al.* 1996, Thomma *et al.* 1998). Diese Hormone, die auch in der Seneszenz eine Rolle spielen (s.1.2.1), induzieren die Bildung von z.B. Phytoalexinen und die Synthese von 'pathogenesis related' Proteinen (Lamb und Dixon 1997). Einige dieser sogenannten *PR*-Gene werden auch während der Blattseneszenz exprimiert (Quirino *et al.* 1999).

Die Blattseneszenz und die Pathogenabwehr haben auf molekularer Ebene eine Reihe von Gemeinsamkeiten (Quirino *et al.* 2000, Obregón *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das Gen eines Zelltod-Markers der hypersensitiven Reaktion auch in späten Phasen der Seneszenz exprimiert wird (Takahashi *et al.* 2004). Umgekehrt werden einige SAGs während der Pathogenabwehr exprimiert, so wie z.B. das Gen für ein seneszenzassoziiertes Metallothionein (Butt *et al.* 1998). Es gibt aber auch molekulare Marker, die spezifisch für die Seneszenz oder die hypersensitive Reaktion sind und zeigen, dass die Regulation der beiden Prozesse nur teilweise überlagert (Pontier *et al.* 1999).

1.3 Regulatorische Gene der Blattseneszenz

Die Regulation der Blattseneszenz ist durch komplexe molekulare Mechanismen gekennzeichnet. Die Identifizierung von regulatorischen Genen, die den Beginn oder das Fortschreiten der Seneszenz kontrollieren, ist in der Seneszenzforschung von großem Interesse. Dazu müssen die Funktionen der seneszenzassoziierten Transkriptionsfaktoren, ihre Zielgene sowie die Signalwege, in die diese involviert sind, aufgeklärt werden. Dabei wird vereinzelt SAGs, die während der Seneszenz in ihrer Expression hochreguliert sind, eine wichtige Rolle als Regulatoren zugeschrieben. Aufgrund der differentiellen Expression der SAGs kann man vereinfacht zwei Klassen voneinander unterscheiden (Gan und Amasino 1997). Zu der Klasse I gehören Gene, die spezifisch während der Seneszenz exprimiert werden und sich von den Genen unterscheiden, die eine während der Seneszenz zunehmende Expression zeigen (Klasse II). Für ein seneszenzassoziiertes Gen der Rezeptorkinase SARK konnte gezeigt werden, dass es früh in der Blattseneszenz exprimiert wird (Hajouj *et al.* 2000). Diese frühe Expression weist darauf hin, dass das Protein eher in frühen Phasen der Seneszenz eine Rolle spielt. Ebenso konnten eine Reihe von Transkriptionsfaktoren isoliert werden, deren Gene eine erhöhte Expression während der Seneszenz aufweisen (Chen *et al.* 2002). Zu den größten Gruppen von Transkriptionsfaktoren, die in der Seneszenz stark hochreguliert sind und auch in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen (Jin

und Martin 1999, Singh *et al.* 2002), zählen die NAC- und WRKY-Transkriptionsfaktoren, C2H2-Zinkfingerproteine, AP2/EREBP-Proteine und die MYB-Transkriptionsfaktoren (Lim *et al.* 2007). Die NAC-Transkriptionsfaktoren stellen mit über 100 Mitgliedern eine der größten Familien von pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren dar. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das *AtNAP*-Gen, das während der natürlichen und der dunkelinduzierten Seneszenz exprimiert ist (Guo und Gan 2006). An ‚Knockout‘-Linien dieses Gens ist eine verzögerte Seneszenz zu beobachten, was auf einen positiven Einfluss des AtNAP-Proteins auf die Seneszenz hinweist. In Weizen wurden mehrere NAC-Proteine identifiziert, die in RNA-Interferenz-Linien eine verzögerte Seneszenz und eine gestörte Remobilisierung der Nährstoffe aufweisen (Uauy *et al.* 2006). Unter den WRKY-Transkriptionsfaktoren sind WRKY53 und WRKY6 am besten untersucht. WRKY53 scheint als positiver Regulator in der frühen Phase der Seneszenz eine Rolle zu spielen (Hinderhofer und Zentgraf 2001), denn ‚Knockout‘-Mutanten zeigen eine verzögerte Seneszenz, während eine induzierbare Überexpression zu einer beschleunigten Seneszenz führt (Miao *et al.* 2004). WRKY6 ist nicht nur während der Seneszenz stark exprimiert, sondern auch bei Pathogenbefall. Über regulatorische W-Box-Sequenzen in Promotoren von Zielgenen ist WRKY6 in der Lage, die Expression dieser Gene während der Seneszenz zu regulieren. So ist WRKY6 ein positiver Regulator des ‚senescence-induced-receptor-like kinase‘-Gens (*SIRK*) aus *A. thaliana* (Robatzek und Somssich 2002). An der Regulation der Seneszenz sind nicht nur induzierende sondern auch reprimierende Faktoren beteiligt. In Reis konnte das Zinkfinger-Protein OsDOS identifiziert werden, das in der Lage ist, die Seneszenz zu verzögern (Kong *et al.* 2006).

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von seneszenzassoziierten Genen identifiziert. Die Analyse der Promotoren dieser Gene brachte bisher jedoch keine sogenannte „Seneszenz-Box“ hervor, die für die seneszenzspezifische Transkription verantwortlich ist. Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist die Regulation der Seneszenz ein komplexes Netzwerk, an dem eine Reihe von Signalwegen beteiligt ist. Dies erschwert die Identifizierung spezifischer *cis*-Elemente zur Regulation der Seneszenz enorm. Die Aufklärung von einzelnen Signalwegen sowie die Identifizierung der Gene, deren Expression von einem Signalweg abhängt würde die Isolierung von spezifischen *cis*-Elementen der Seneszenz ermöglichen und somit zum Verständnis der Regulation der Seneszenz beitragen.

1.4 Das *HvS40*-Gen

Das *HvS40*-Gen der Gerste (*Hordeum vulgare*), das in dieser Arbeit untersucht werden soll, wurde erstmals aus einer cDNA-Bank von Primärblättern der Gerste isoliert, in denen die Seneszenz durch Dunkelinkubation ausgelöst wurde (Becker und Apel 1993). Des Weiteren ist bekannt, dass das Transkript des Gens auch in seneszierenden Fahnenblättern der Gerste *Hordeum vulgare* L. cv. ‚Carina‘ verstärkt akkumuliert. Dabei geht die Expression des Gens einher mit einer Abnahme in der Effizienz des Photosystems II (Humbeck *et al.* 1996). Das *HvS40*-Gen liegt im Genom nur in einer Kopie vor und wird auf der Ebene der Transkription reguliert (Scharrenberg 2001). Die Expression des *HvS40*-Gens kann auch durch Pathogenbefall und durch die Behandlung mit den Phytohormonen Abscisinsäure, Ethylen, Methyljasmonat und Salicylsäure ausgelöst werden (Haußühl 1998, Krupinska *et al.* 2002, Dähnhardt 2003). Unverstanden ist die Verminderung der Expression unter gleichzeitiger Zugabe von Salicylsäure und Methyljasmonat (Tab.1). Auch abiotischer Stress, wie z.B. Verwundung, Trockenheit und Osmose, führen zu einer Erhöhung der Expression des Gens. In Tabelle 1 ist eine Zusammenfassung zur Expression des *HvS40*-Gens dargestellt.

Tab. 1 Zusammenfassung zur Expression des *HvS40*-Gens in Gerstenblättern. Zeichenerklärung: Veränderung der Transkriptmenge: - keine, ↑ gering erhöht, ↑↑ stark erhöht, ↓ reduziert. ABA = Abscisinsäure, BAP = 6-Benzylaminopurin, MeJa = Methyljasmonat, SA = Salicylsäure, *E. graminis* = *Erysiphe graminis*, *P. teres* = *Pyrenophora teres*, *R. secalis* = *Rhynchosporium secalis*. Referenzen: (1) Haußühl 1998, (2) Krupinska *et al.* 2002, (3) Dähnhardt 2003.

Hormon:						
ABA _(1,2,3)	BAP ₍₁₎	Ethylen ₍₁₎	Kinetin	MeJa _(1,2)	SA _(1,2)	SA+MeJa ₍₁₎
↑↑	↑	↑↑	-	↑↑	↑↑	↓
Abiotischer Stress:						
Verwundung ₍₁₎	Licht ₍₁₎	H ₂ O ₂ ₍₃₎	anhaltende Trockenheit ₍₁₎	Osmose ₍₁₎	Hitze (42°C) ₍₁₎	Kühle (2°C/5°C) ₍₁₎
↑	-	↑	↑	↑	↑	-
Pathogen:						
<i>E. graminis</i> (biotroph) ₍₁₎	<i>R. secalis</i> (nekrotroph) ₍₁₎	<i>P. teres</i> (nekrotroph) ₍₁₎				
↑	-	↑↑				

Das *HvS40*-Gen kodiert für ein 15,4 kD Protein, dessen Funktion unbekannt ist. Der einzige Hinweis für eine Rolle des Proteins im Zellkern ist die subzelluläre Lokalisation einer Fusion mit dem Reporterprotein β -Glucuronidase (GUS) in Zwiebelepidermiszellen. In transienten Transformationsansätzen konnte nachgewiesen werden, dass das Protein sowohl im Zellkern als auch in geringer Menge im Cytoplasma akkumuliert (Krupinska *et al.* 2002).

Als Promotorregion des *HvS40*-Gens wurde ein Bereich von 840 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstarts festgelegt (Haußühl 1998). Durch die Untersuchung des Promotors auf Bindemotive, die während der Seneszenz an der Regulation des Gens beteiligt sein könnten, wurden zwei Motive identifiziert (Dähnhardt 2003). Das Motiv 1 besteht aus einer 'inverted repeat' Box 2 (IR2) in Verbindung mit einer W-Box im Abstand von 5 Basenpaaren zueinander. Das Motiv 2 besitzt ebenfalls die zwei genannten Elemente des Motivs 1, sowie eine zusätzliche Box, die als IR1-ähnliche Box bezeichnet wird (Abb. 2).

ERE	5' - <u>TGACAnnnn</u> <u>TGTCA</u> - 3'
	IR1 IR2
Motiv 1	5' - <u>TGTCAGAAAAT</u> <u>TGGTCA</u> - 3'
	IR2 W-Box
Motiv 2	5' - <u>TGAGAACTCTGTCAAATATTGGTCA</u> - 3'
	IR1-ähnlich IR2 W-Box

Abb. 2 Darstellung der Sequenzen der Motive 1 und 2 des *HvS40*-Promotors im Vergleich zum ERE-Element (Després *et al.* 1995). Abgebildet ist nur der kodierende Strang. Die 'IR'-Sequenzen sowie die W-Boxen sind unterstrichen hervorgehoben.

Die IR-Boxen repräsentieren das 'elicitor response element' (ERE-Element) des *PR10a*-Promotors der Kartoffel (Després *et al.* 1995, Desveaux *et al.* 2000). Die im *HvS40*-Promotor vorkommende IR1-Box ist imperfekt, da sie anstelle eines Cytosins ein Guanin besitzt, und wurde deshalb nur als IR1-ähnlich definiert (Abb. 2). Die W-Boxen sind als DNA-Bindemotive der WRKY-Transkriptionsfaktoren bekannt (Eulgem *et al.* 2000). Unter Verwendung eines Oligonukleotids des Motivs 2, das nur aus der IR2-Box und der W-Box bestand, wurde in Gelretardierungsexperimenten aus Zellkernproteinen fünf Tage alter Primärblätter der Gerste ein Bindeprotein isoliert. Nach Ermittlung der Aminosäuresequenz von Peptiden des Bindeproteins wurde dieses als Whirly1-Transkriptionsfaktor identifiziert (Dähnhardt 2003).

Whirly1 zählt zu einer neuen Familie pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren, die an DNA-Einzelstrang binden (Després *et al.* 1995, Desveaux *et al.* 2005). Vertreter dieser Familie besitzen das charakteristische Motiv KGKAAL, das für die DNA-Bindeaktivität verantwortlich ist. Das erste Whirly-Protein ‚p24‘ wurde aus Kernproteinen von Kartoffelknollen isoliert und als StWhy1 bezeichnet (Després *et al.* 1995). Es ist eine Untereinheit des PBF-2-Komplexes (*PR10a*-Bindefaktor 2), der an das ‚elicitor response element‘ (ERE) des *PR10a*-Promotors im Zellkern bindet (Desveaux *et al.* 2000). Der Komplex setzt sich aus einem Tetramer von Why1-Proteinen zusammen, die jeweils an DNA-Einzelstränge binden können und damit eine gewundene Quartärstruktur bilden, die als ‚Whirly‘ bezeichnet wird (Desveaux *et al.* 2002).

A. thaliana besitzt drei Whirly-Proteine, von denen AtWhy1 eine zum StWhy1 vergleichbare Funktion besitzt. Durch die Zugabe von Salicylsäure konnte die DNA-Bindeaktivität des AtWhy1-Proteins induziert werden, das als Aktivator von Abwehrgenen der systemisch erworbenen Resistenz agieren kann. Dem AtWhy1 wird eine basale Funktion in der durch SA induzierten Resistenz gegenüber Pathogenen zugesprochen (Desveaux *et al.* 2004).

Eine neue Arbeit zeigt, dass das AtWhy1-Protein nicht nur in die Regulation der Abwehrgene involviert ist, sondern auch in den Erhalt der Telomerlänge (Yoo *et al.* 2007). Telomere sind Nukleoprotein-Komplexe am Ende eukaryotischer Chromosomen. Sie sind essentiell für den Erhalt der Chromosomenintegrität, indem sie Schutz vor exonukleolytischem Abbau bieten. Telomere werden durch die Aktivität der Telomerase, einem Ribonukleoprotein mit reverser Transkriptase-Aktivität, synthetisiert und erhalten. Pflanzliche Telomere bestehen aus Wiederholungen des charakteristischen Heptanukleotids TTAGGG von mehreren Kilobasen Länge (Shippen und Knight 1998). Die Telomerase-Aktivität in Gerste ist hoch in reproduktiven und nahezu erloschen in vegetativen Geweben. So konnte in jungen Embryonen der Gerstensorte ‚Golden Promise‘ eine Telomerlänge von 80 kb und in Blättern eine Länge von 23 kb festgestellt werden (Kilian *et al.* 1995). Telomerverkürzungen führen letztendlich zur Störung der Zellteilung und fördern damit die zelluläre Seneszenz (Harley 1991). Da AtWhy1-‚Knockout‘-Mutanten im Laufe mehrerer Generationen eine stetige Zunahme der Telomerlänge zeigen, während AtWhy1-überexprimierende Pflanzen verkürzte Telomere und eine geringere Telomerase-Aktivität besitzen, wird dem Protein eine Funktion als negativer Regulator der Telomerase zugesprochen (Yoo *et al.* 2007).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion und Regulation des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens der Gerste geklärt werden. Um Hinweise auf die Funktion des HvS40-Proteins zu erlangen, soll im Rahmen dieser Arbeit die Aminosäuresequenz des Proteins genauer charakterisiert werden. Des Weiteren soll das Gen sowohl in Gerste als auch in *A. thaliana* überexprimiert werden. Von einer Charakterisierung der transgenen Pflanzen sind Hinweise zur Funktion des Proteins zu erwarten.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht darin, zu untersuchen, ob in der Modellpflanze *A. thaliana* ein zum HvS40-Protein der Gerste homologes Protein existiert. Aufgrund von Sequenzhomologien auf Proteinebene sollen in Frage kommende Gene aus *A. thaliana* im Hinblick auf ihre Expression charakterisiert werden. Dazu sollen Bedingungen getestet werden, unter denen auch das *HvS40*-Gen aktiv ist, wie unter anderem Seneszenz, Phytohormone und Pathogene. Ein mögliches zum HvS40 homologes Protein soll auf seine subzelluläre Lokalisation im Zellkern überprüft werden. Im Hinblick auf die Seneszenz soll die Funktion des homologen Proteins aus *A. thaliana* gegebenenfalls über die Analyse von T-DNA-Insertionslinien geklärt werden. Durch einen Vergleich zwischen den T-DNA-Linien des homologen Gens und der Überexpression des *HvS40*-Gens in *A. thaliana* kann gegebenenfalls eine Funktion für das HvS40-Protein der Gerste abgeleitet werden.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass das *HvS40*-Gen auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit soll analysiert werden, ob der Promotorbereich über *cis*-Elemente verfügt, die für das bekannte Expressionsmuster des *HvS40*-Gens verantwortlich sein können. Es konnte bereits der Transkriptionsfaktor Whirly1 identifiziert werden, der an das Motiv 2 des *HvS40*-Promotors bindet. Es soll die Bindung des überexprimierten Whirly1-Proteins der Gerste (HvWhy1) an die Motive 1 und 2 des *HvS40*-Promotors untersucht werden. Zum Vergleich soll geprüft werden, ob das HvWhy1-Protein an Telomersequenzen bindet, so wie es bereits für das AtWhy1-Protein aus *A. thaliana* beschrieben wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Laborchemikalien waren von reinster Qualität und stammten von den Firmen Amersham GE Healthcare (Freiburg), Bio-RAD (München), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München). Die Radionukleotide α - ^{32}P -dCTP und γ - ^{32}P -ATP wurden mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/ mmol von der Firma Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

Die Restriktionsendonukleasen sowie DNA- (,1 kb DNA-Ladder', ,100 bp DNA-Ladder', ,Lambda-Marker') und Protein-Größenstandards (,Prestained-Protein-Ladder 10 - 180 kD') wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Alle anderen Enzyme für die Modifikation von Nukleinsäuren stammten von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und Promega (Mannheim).

Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das mit Hilfe einer Millipore-Anlage (Seradest SD 2000, USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) deionisiert wurde. Die Lösungen, die für Arbeiten mit Nukleinsäuren Verwendung fanden, wurden für 20 min bei 120°C autoklaviert.

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 Anzucht von *A. thaliana*

Die Samen von *A. thaliana* wurden vor Aussaat oberflächlich sterilisiert, wenn sie zuvor mit Agrobakterien behandelt oder steril auf Platten mit MS-Medium angezogen werden sollten. Dazu wurden die Samen für 3 min in 70 % [v/v] Ethanol geschüttelt und anschließend für 2 min mit 0,6 % [v/v] Natrium-Hypochlorid, das mit 0,05 % [v/v] Tween 20 versetzt war, gewaschen. Nach dreimaligem Waschen in sterilem Wasser konnten die Samen dann auf MS-Platten für 2 Wochen bei 21°C im Licht-/Dunkelrhythmus (10 h/ 14 h) vorgekeimt oder direkt auf einer Mischung aus Topfkultursubstrat 2 (Floragard, Oldenburg) und Sand (Verhältnis 1:1) angezogen werden. Die verwendete Lichtintensität in der Klimakammer entsprach ca. 110 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PPFD.

MS-Platten (pH 5,8/KOH)

87 mM Saccharose

0,75 % [w/v] Phyto Agar

in 1 x MS-Medium (M0245, Duchefa)

2.2.2 Blattmaterial für die Analyse der Seneszenz von *A. thaliana*

Für die Ernte von seneszenten Stadien im Verlauf der natürlichen Alterung von *A. thaliana* wurde eine Einstufung in vier Stadien gewählt (Otegui *et al.* 2005). Die Stadien, die durch ihren relativen Chlorophyllverlust pro Blatt charakterisiert sind (NS = 0 %, S1 = 30-50 %, S2 = 50-75 % und S3 = >75 %), wurden für jedes einzelne Blatt ermittelt. Dazu wurde in der Mitte der Blattspreite der relative Chlorophyllgehalt mit einem Chlorophyll-Meter (SPAD-502, Minolta, Japan) bestimmt. Somit konnte Material gleichen Stadiums von unterschiedlichen Pflanzen geerntet werden (Abb. 3).

Für den Ansatz der dunkelinduzierten Seneszenz wurden 4 - 6 Wochen alte Pflanzen (Abb. 4) für 1, 2, 3 und 4 Tage dunkel gestellt und anschließend die gesamte Rosette der Pflanze geerntet. Als Kontrollen wurden Pflanzen verwendet, die weiter im Licht-/Dunkelrhythmus angezogen wurden.



Abb. 3 Einstufung der Stadien für die Analyse der Genexpression während der natürlichen Seneszenz. Die Rosettenblätter von *A. thaliana* wurden durch Messung des relativen Chlorophyllverlustes in die Stadien NS, S1, S2 und S3 eingestuft (nach Otegui *et al.* 2005).

2.2.3 Behandlung von *A. thaliana* mit Phytohormonen und Pathogenen

Die Phytohormone Abscisinsäure, Methyljasmonat und Salicylsäure wurden in Leitungswasser gelöst und mit einem Tropfen Detergenz Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) versehen, um eine Aufnahme durch die Blätter zu erleichtern. 4 - 6 Wochen alte Pflanzen von *A. thaliana* (Abb. 4) wurden mit jeweils einer 100 µM Lösung Abscisinsäure und Methyljasmonat sowie mit einer 4 mM Lösung Salicylsäure gründlich besprüht und für jeweils 1, 2, 3 und 4 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gesamten Rosettenblätter einer Pflanze geerntet. Als Kontrollen dienten Pflanzen, die mit Leitungswasser, das nur Silwet L-77 enthielt, besprüht wurden.



Abb. 4 Foto einer 4 - 6 Wochen alten Pflanze von *A. thaliana* in dem Stadium, in dem sie für die Hormonversuche und die Analyse der dunkelinduzierten Seneszenz eingesetzt wurde.

Die Infektion mit dem biotrophen virulenten Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und dem nekrotrophen Pilzerreger *Botrytis cinerea* wurde in Kooperation mit Professor Dr. Roitsch aus Würzburg durchgeführt. Nach 6 - 7 Wochen Anzucht im Licht-/ Dunkelrhythmus (9 h/15 h) bei einer Lichtintensität von $180 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PPFD wurden Blätter von *A. thaliana* Col-0 mit den Erregern infiziert und nach 1 und 2 Tagen geerntet. Dazu wurden die Blätter mit jeweils 10 - 20 μl einer Suspension von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (108 cfu/ml 10 mM MgCl_2 -Lösung) infiltriert. Für die Infektion mit *Botrytis cinerea* wurden 10 μl Pilzsporen (9×10^5 Sporen/ml PDA-Medium) auf kleinen Verwundungsstellen appliziert. Als Kontrollen für die Behandlung dienten eine 10 mM MgCl_2 -Lösung und PDA-Medium (2,4 % [w/v] Difco™Potato Dextrose Broth (DB Diagnostics, Maryland, USA)).

2.2.4 Anzucht und Ernte der T-DNA-Insertionslinien

Die Pflanzen der T-DNA-Linien $\Delta_1\text{AtS40-3}$ (SALK_076786, 2.14) und $\Delta_2\text{AtS40-3}$ (GABI-Kat_669C11, s. 2.14) wurden zusammen mit dem Wildtyp *A. thaliana* Col-0 des SALK-Instituts auf Erde ausgesät (s. 2.2.1). Die Anzucht erfolgte für 11 Wochen in der Klimakammer. Während dieses Zeitraumes wurden die 16 ersten Blätter von je 5 Pflanzen einer Linie nach Bildung der Primärblätter wöchentlich mit farbigen Bändern markiert. Darüber war es möglich, im Laufe der Entwicklung der Pflanzen gleich alte Blätter verschiedener Linien einander zuzuordnen zu können. Für den phänotypischen Vergleich zwischen den T-DNA-Linien und dem Wildtyp wurden neben der Ernte des gesamten Blattmaterials die markierten Blätter der sechsten bis zehnten Woche einer Pflanze zur Dokumentation eingescannt.

2.2.5 Selektion der Pflanzen über das Herbizid BASTA

Die transgenen Samen von *A. thaliana* wurden vor Aussaat oberflächensterilisiert (s. 2.2.1), um weiteren Infektionen mit Agrobakterien vorzubeugen. Die Selektion wurde an 2 - 4 Wochen alten Pflanzen durchgeführt, indem die jungen Pflänzchen alle drei Tage mit einer 0,1 %igen [v/v] Lösung des Blattherbizids BASTA reichlich besprüht wurden. Die Vertrocknung der nicht resistenten Pflanzen war nach einer Woche deutlich zu erkennen und eine weitere Selektion nicht mehr erforderlich. Die resistenten Pflanzen besitzen nach erfolgreicher Transformation das *bar*-Gen als Selektionsmarker. Es kodiert für die Phosphinotricin-Acetyltransferase, die das Herbizid inaktiviert und damit das Überleben der Pflanze unter BASTA-Selektion ermöglicht. BASTA enthält ein Analogon der chemischen Substanz Phosphinotricin, das die Glutaminsynthetase in Pflanzenzellen inhibiert. Die damit verbundene Akkumulation von Ammonium ist für die Pflanze toxisch und führt zum Absterben.

2.2.6 Anzucht und Ernte von Gerste

Das Saatgut der Sommergerste *Hordeum vulgare* L. cv. ‚Steffi‘ wurde von der Firma Ackermann Saatzucht (Irlbach) bezogen. Die Pflanzen wurden auf Einheitserde in einem Licht-/Dunkelrhythmus (16 h, 21°C / 8 h, 18°C) bei einer Lichtintensität von 125 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PPFD in der Klimakammer angezogen. Nach 9 Tagen (9d) waren die Primärblätter ausgewachsen und wurden für drei Tage dunkel gestellt (9 + 3dD), um die Seneszenz zu induzieren (Kleber-Janke 1996).

2.3 Oligonukleotide

In diesem Abschnitt sind die Oligonukleotide aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden. Die Oligonukleotide sind mit ihrer Bezeichnung und ihrer Sequenz in 5'-3'-Orientierung angegeben. In den Tabellen zu den Transformationskonstrukten und der RT-PCR sind die Oligonukleotide paarweise zugeordnet.

Tab. 2 Oligonukleotide für die Erstellung der Transformationskonstrukte

Auflistung der Oligonukleotide, die zur Herstellung von Konstrukten zur transienten und stabilen Transformation verwendet wurden. Zur besseren Zuordnung sind die Oligonukleotide thematisch zu Abschnitt 2.4 unter Angabe der verwendeten Vektoren und Konstruktbezeichnungen sortiert. Spezifische Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind in kleinen Buchstaben dargestellt.

Name	Sequenz	Vektor	Konstrukt/Fusion
Vektoren zur transienten Transformation			
<i>AtWhy1</i> for <i>AtWhy1</i> rev	tgcctgcagATGTCGCAACTCTTATCG acctgcagATTCCATTCATAGTCTCC	pBS SK-GFP	AtWhy1-GFP
<i>AtWhy1-1</i> for <i>AtWhy1</i> rev	ttctgcagATGCTCTTCTCGGTAAAGTC s.o.	pBS SK-GFP	ΔPTP-AtWhy1-GFP
<i>AtWhy2</i> for <i>AtWhy2</i> rev	acctgcagATGATGAAGCAAGCC acctgcagTTTATCCCACTCC	pBS SK-GFP	AtWhy2-GFP
<i>AtWhy3</i> for <i>AtWhy3</i> rev	agctgcagTCATCGTAATCCCGC ggctgcagGTTTTCGGAAGAAGACG	pBS SK-GFP	AtWhy3-GFP
U22603 for <i>Bam</i> HI U22603 rev <i>Bam</i> HI	GcgggatccATGTCGGAAG cgcggtatccAGCTTCCAAA	pBI221	AtS40-1-GUS At1g29640-GUS
<i>At5g45630</i> for <i>Xba</i> I <i>At5g45630</i> rev <i>Bam</i> HI	gctctagaATGTCAGAAG gcgggatccAGCTTCTAAAAAACC	pBI221	AtS40-2-GUS At5g45630-GUS
U60771 for <i>Xba</i> I U60771 rev <i>Bam</i> HI	gctctagaATGTCAGAAGAA gcgggatccAACTTCCAAA	pBI221	AtS40-3-GUS At4g18980-GUS
U19481 for <i>Xba</i> I U19481 rev <i>Bam</i> HI	gctctagaATGGCGACGAGCAAG gcgggatccATCTTCGATCCCTCT	pBI221	AtS40-4-GUS At2g28400-GUS
U22922 for <i>Xba</i> I U22922 rev <i>Bam</i> HI	gctctagaATGGCAAGAGGTCG gcgggatccGCCGTAGAACCC	pBI221	At1g11700-GUS
<i>At1g61930</i> for <i>Xba</i> I <i>At1g61930</i> rev <i>Bam</i> HI	gctctagaATGGCAAAAGGTCGA gcgggatccGCCGTAGAACCCTGT	pBI221	At1g61930-GUS
<i>At3g15040</i> for <i>Xba</i> I <i>At3g15040</i> rev <i>Bam</i> HI	GctctagaATGAATAAAATCCA gcgggatccATCTATGAAACCGGT	pBI221	At3g15040-GUS
Vektoren zur Transformation von Gerste			
T7 <i>Spe</i> I SP6 <i>Spe</i> I	ccactagtTAATACGACTCACTATAGGG ggactagtCGATTAGGTGACACTATAG	pJH260	<i>pAct::HvS40</i>
5' <i>Nco</i> Prom 3' Prom S40	ACATAGccatggTCCGGAATCTTCAC CTGATGATCCATATCGATCTCGGTGGACTGT	HC345	<i>pHord::HvS40</i>
5' Prom S40 3' S40 <i>Kpn</i> I	ACAGTCCACCGAGATCGATATGGATCATCAG cgctaggtaccTCACTTCTCGATGAATC	HC345	<i>pHord::HvS40</i>
<i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III Adapter (Überhang)	5'-AATTCGCCTGCAGCA-3' 3'-GCGGACGTCGTCGA-5'	HC345/S40	<i>pHord::HvS40</i>

Fortsetzung Tab. 2

Gateway- Vektoren			
Name	Sequenz	Vektor	Konstrukt/Fusion
TOPOHvWhy1 for HvWhy1 rev-2	CACCATGGAGAGGGAGCCGC CCTTCGCCACTCCAATTCGGG	pBat-TL-GFP2	Δ PTP-HvWhy1- GFP
TOPOS40 for S40 rev ohne Stopp	CACCATGGATCATCAGGA CTTCTCGATGAATCCGGT	pBat-TL-GFP2	HvS40-GFP
TOPOSAG13 for NOS revEcoRI	CACCTCAGTGTCTCTTAAATC acgaattcCCGATCTAGTAACATAGATGAC	pBGW	pSAG13::HvS40- HA
TOPOS40 for 3'TagS40	CACCATGGATCATCAGGA ccgggtaccTCAGGCGTAATCTGGGACATCGT- ATGGGTACTTCTCGATGAATCCG	pB2GW7	p35S::HvS40-HA

Tab. 3 Oligonukleotide für die RT-PCR

Im Folgenden sind hier die Oligonukleotide aufgelistet, die für die semiquantitative RT-PCR eingesetzt wurden. Die Größen der amplifizierten Fragmente sind, falls nicht anders angegeben, für die PCR-Produkte der cDNA aufgeführt.

Name	Sequenz	Fragment-Größe [in bp]
pp 18S for pp 18S rev pp Comp-sense 18S pp Comp-anti 18S	AGGAATTGACGGAAGGGCAC GGACATCTAAGGGCATCACA AGGAATTGACGGAAGGGCAC-Pho GGACATCTAAGGGCATCACA-Pho	315
lhca1 P1 (At3g54890) lhca1 nested	ATGGCTGCTCACTGGA GCAAAGTACCCACGG	290 gDNA 680
AtSen1 for (At4g35770) AtSen1 rev	CACAACATCACGAATTGAAACTGG CAGCTCATCTCTGTCCAAGCGAC	510 gDNA 850
AtSAG12 for (At5g45890) AtSAG12 rev	CCACTCGACAATGAATCAT TCTGACTCAGTTGTCAAGCC	560 gDNA 820
SAG13 P1 SAG13 rev	CGATGAAGAGTTTAAGAA CCAAACACATGCATATGT	200
PR1 for (At2g14610) PR1 rev	AAGCTCAAGATAGCCC CACTTIGGCCACATCCG	330
hpd for (At1g06570) hpd rev	ATCCGATCTTCCACCG CCTCTACACGCTCGAACC	410
PDF1.2 for (At5g44420) PDF1.2 rev	ATGGCTAAGTTTGCTTCC GATACACTGTGTGCTGG	225
Gruppe I		
At2g34340 P1 At2g34340 nested	CTGAGGTAGTGTCTCCG AATCCGAACCCGGCTCAG	350
At1g29640 P1 (AtS40-1) At1g29640 nested	GAGTGTGGAACAAGTC ACGCCATTGACCTCC	200
At5g45630 P1 (AtS40-2) At5g45630 nested	CGACGAGAAGAAGGGTAC CCGGTCATCCTAAGAACG	230
At4g18980 P1 (AtS40-3) At4g18980 nested	ACGATCTTCAATGTCAG TTTCGATTATGACATGTG	220

Gruppe II		
Name	Sequenz	Fragment-Größe [in bp]
<i>At4g04630</i> P1 <i>At4g04630</i> nested	GCCGTAGGGTTCCTCAA TGGGGCTGACAAGTCATC	750
<i>At4g21970</i> P1 <i>At4g21970</i> nested1	CCTGACTGGTCCAAGGTT GAGAAAAATGGTATGGGC	560
<i>At4g26950</i> P1 <i>At4g26950</i> nested	GCTATGGGGAGATGGAGA ATGATCGACTGCGCCGCA	300
Gruppe III		
<i>At5g0680</i> P1 <i>At5g0680</i> nested	ACCGCTTCCGATTCAGGT CAATGTCCTCCCTACTCC	350
<i>At3g45210</i> P1 <i>At3g45210</i> nested	CGTACCCGGAGATTCAGA TTCCCTTCAATGTCCTCCC	300
<i>At2g28400</i> P1 (<i>AtS40-4</i>) <i>At2g28400</i> nested	CGAGCTAGACGAATGGGA AGTCCTCCCAGCACCTTC	340
<i>At5g03230</i> P1 <i>At5g03230</i> nested	CCAGAGATGTCCGATGAG GCGTTCCTCAATCGCCTT	305
Gruppe IV		
<i>At1g11700</i> P1 <i>At1g11700</i> nested	GGAATCTCATGGAGCGTG GGCTCTTCGCCAAGTACT	320
<i>At1g61930</i> P1 <i>At1g61930</i> nested	AGGAATCCTACGGCACGT AAATCGCGTCACGAACGC	410
<i>At4g21930</i> P1 <i>At4g21930</i> nested	ATGTCTGGTCGGTGGTCG GTCTCTGACCCGTCTCAT	400
Gruppe V		
<i>At3g15040</i> P1 <i>At3g15040</i> nested	GAATGTGGAAGCGTCTGG CTCCTTCAAGCACAGAGC	450
Nachweis des <i>HvS40</i>-Gens		
<i>HvS40</i> for1 <i>HvS40</i> rev 3'UTR	GCCGACGTCCTCTGGC TCACCTCTGCTCTCACCG	500
<i>HvS40</i> for1 <i>HvS40</i> rev2	s.o. GAGGACGAGGTTCTGATA	360

Tab. 4 Oligonukleotide zur Analyse der T-DNA-Insertionslinien

Zur Analyse genomischer DNA der T-DNA-Linien wurden Oligonukleotide verwendet, die mit Hilfe der Datenbanken des SALK-Instituts und des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung (Köln) ermittelt wurden.

Name	Sequenz	Anwendung
GS	TTCGTAGTTTCGTGTGTGAC	genspezifischer Primer für GABI_669C11-Linie
T-DNA GABI	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	T-DNA Primer der GABI-Kat-Linie
LP	CTTGTCGAAAGCAACAAATC	linker genspezifischer Primer für SALK_076786
RP	AAAGCCGGTCATCCTAAGAAC	rechter genspezifischer Primer für SALK_076786-Linie
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA Primer der SALK-Linie

Tab. 5 Oligonukleotide für die Gelretrardierungsexperimente

Folgende Oligonukleotide wurden für die Gelretrardierungsexperimente (s. 2.7.2 und 2.11.2) eingesetzt (M1 = Motiv 1, M2 = Motiv 2, CS = kodierender Strang, NCS = nicht kodierender Strang, Tel = Telomer).

Name	Sequenz
M1-CS	TATTCAATTTGTATGTCAGAAAATGGTCAAATG
M1-NCS	CATTGACCATTTTCTGACATACAAATTGAAATA
M2-CS	CCGTGTGAGAACTCTGTCAAATATTGGTCAAACG
M2-NCS	CGTTGACCAATATTGACAGAGTTCTCACACGG
5'Tel	TTAGGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGG
3'Tel	CCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAA
Tel-RNA (4x)	CUAAACCCUAAACUAAACCCUAAACUAAACCCUAAACUAAACCCUAAA

Tab. 6 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Zur Sequenzierung erstellter Konstrukte wurden Oligonukleotide verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert waren (MWG Biotech, Ebersberg).

Name	Sequenz	Anwendung
M13 universe	AGGGTTTCCCAGTCACGACGT	Standardvektor
M13 reverse	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG	Standardvektor
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Standardvektor
SAG13pro	TTCGTACTACGTCTACCCCTCTCA	Bindung am 3'Ende des <i>SAG13</i> -Promotors
Hordeinprom	GTGTTGGCAAACCTGCACTGTCCA	Bindung am 3'Ende des Hordein-Promotors
35Spromot_1	ATTGATGTGATATCTCCACTGACG	Bindung am 3'Ende des <i>35S CaMV</i> -Promotors
GFPprev	TGAACCTGTGGCCGTTACAG	Bindung am 5'Ende des <i>gfp</i> -Gens

2.4 Herstellung der Transformationsvektoren

Vektoren zur transienten Transformation

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Proteine AtWhy1 und AtWhy2 wurden die kodierenden Sequenzen mittels PCR (s. 2.5.3.2) aus den cDNA Klonen U10139 und U19840 (Ohio State University, Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) /DNA Stock Center) amplifiziert. Die Sequenz des *AtWhy3*-Gens lag nicht als cDNA vor, und somit wurde das erste Exon aus genomischer DNA von *A. thaliana* amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide besaßen eine *Pst*I-Schnittstelle (s. 2.3, Tab. 2), die für die Ligation (s. 2.5.3) in den Vektor pBS SK-GFP, der den *35S CaMV*-Promotor enthält (AG Krupinska), verwendet wurde.

Zur subzellulären Lokalisation der Proteine AtS40-2, AtS40-3 und AtS40-4 von *A. thaliana* wurde der Vektor pBI221 (AF502128) verwendet. Die PCR-Produkte der kodierenden Sequenzen der

Gene waren mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BamHI* versehen (s. 2.3, Tab. 2), die für die Ligation zwischen den 35S *CaMV*-Promotor und das *uidA*-Gen der Glucuronidase (GUS) verwendet wurden. Als Matrize zur Amplifizierung der kodierenden Sequenzen der Gene *AtS40-3* (*At4g18980*) und *AtS40-4* (*At2g28400*) dienten die cDNA-Sequenzen U60771 und U19481 (Ohio State University, Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)). Die Sequenz des Gens *AtS40-2* (*At5g45630*) wurde aus genomischer DNA gewonnen.

Vektoren zur Transformation von Gerste

Zur Transformation von *Hordeum vulgare* L. cv. 'Golden Promise' wurden drei unterschiedliche Konstrukte erstellt, die im Folgenden beschrieben werden.

pAct::HvS40

Die kodierende Sequenz des *HvS40*-Gens lag in der Arbeitsgruppe bereits im Vektor „pAct1.cas“ vor. In diesem „ActS40 sense“-Plasmid (Klon 15) steht das Gen unter Kontrolle des Aktin-Promotors aus Reis und beinhaltet zusätzlich einen NOS-Terminator der Nopalin-Synthase. Die gesamte Kasette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden T7 *SpeI* und SP6 *SpeI* amplifiziert (s. 2.3, Tab. 2) und in den pGem-T-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert (s. 2.5.3). Nach Sequenzierung des Produktes (s. 2.3, Tab. 6 und 2.5.4) wurde das Fragment durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *SpeI* (s. 2.5.3.1) in den binären Vektor pJH260 (Horvath *et al.* 2003) ligiert, der von Professor Dr. Diter von Wettstein (Pullman, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

pHord::HvS40

Der Promotor des D-Hordein-Gens (*Hor3-1*) lag in dem Plasmid HC345 (von Wettstein, Pullman, USA), das zusätzlich noch einen NOS-Terminator enthielt, vor. Für die Amplifizierung der kodierenden Sequenz des *HvS40*-Gens wurde der genomische „1 kb *HindIII*“-Klon (Haußühl 1998), der in der Arbeitsgruppe vorhanden war, verwendet. Zunächst wurden aus diesen beiden Plasmiden mittels PCR der 3'-Bereich des Hordeinpromotors (ab der *NcoI*-Schnittstelle) und das *HvS40*-Gen amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass der 3'-Bereich des Hordeinpromotors (5' *NcoI* Prom, 3' Prom S40, s. 2.3, Tab. 2) mit dem 5'-Bereich des *HvS40*-Gens (5' Prom S40, 3' S40 *KpnI*) überlappt. Die überlappenden Bereiche der PCR-Produkte wurden anschließend hybridisiert (Abb. 5), vervollständigt und mittels PCR mit den Oligonukleotiden 5' *NcoI* Prom und 3' S40 *KpnI* (s. 2.3, Tab. 2) vervielfältigt. Dieses aus dem 3'-Bereich des Hordeinpromotors und der kodierenden Sequenz des *HvS40*-Gens bestehende Produkt wurde mit den Endonukleasen *NcoI* und *KpnI* restringiert und in den HC345-Vektor ligiert (Abb. 5). Der resultierende Klon HC345/S40 wurde mit *EcoRI* restringiert, um an diese Schnittstelle einen

EcoRI/HindIII-Adapter (s. 2.3, Tab. 2) zu ligieren. Anschließend erfolgte eine Restriktion mit der Endonuklease *HindIII*, über die das gesamte Fragment in den binären Vektor pJH260 (von Wettstein, Pullman, USA) ligiert werden konnte.

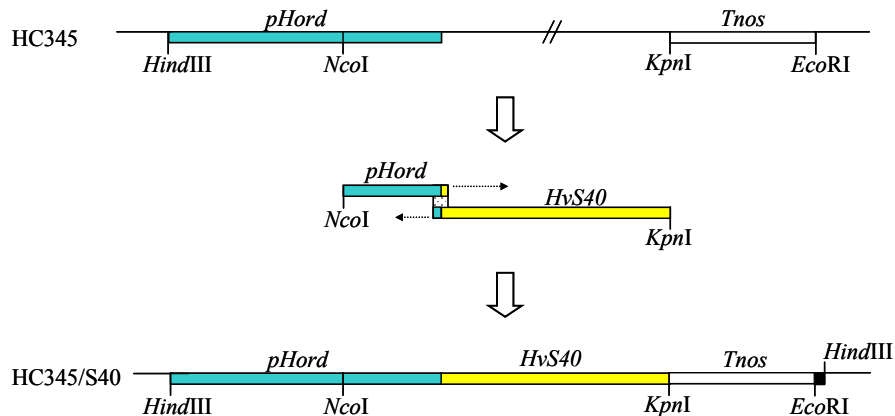


Abb. 5 Schema zur Herstellung des HC345/S40-Klons. *pHord* = Hordeinpromotor, *Tnos* = NOS-Terminator, *HvS40* = kodierende Sequenz des *HvS40*-Genes, schwarzer Kasten = *EcoRI/HindIII*-Adapter.

pUbi::HvS40

Die *HvS40*-Sequenz wurde mit der Endonuklease *NcoI* aus dem genomischen „1 kb *HindIII*“-Klon (Haußühl 1998) herausgeschnitten und ‚blunt end‘ in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pUC19 (MBI Fermentas, St- Leon-Rot) ligiert. Das Fragment wurde mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* restringiert und in den pUbi-AB-Vektor kloniert, der den Ubiquitinpromotor und einen NOS-Terminator enthält. Über zwei *SfiI*-Schnittstellen konnte die im pUbi-AB-Vektor entstandene Kasette in den binären Vektor P6d35S ligiert werden. Die von Hausmann und Toepfer (1999) entwickelten Plasmide pUbi-AB und P6d35S, die von Dr. Jochen Kumlehn (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben) zur Verfügung gestellt wurden, stammten vom ‚DNA-Cloning-Service‘ (Hamburg).

Gateway-Vektoren

Das Grundprinzip der Klonierung mit den Gateway-Vektoren ist die homologe Rekombination, bei dem definierte Rekombinationsseiten zweier Vektoren einen gezielten Austausch von Sequenzen ermöglichen (s. 2.5.3). Als Ausgangsvektor diente der Vektor pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe), in den ‚blunt-end‘-PCR-Produkte, die mit der Erkennungssequenz CACC im 5'-Bereich beginnen, ligiert werden können. Als Zielvektoren dienten die binären

Vektoren pBGW, pB2GW7 (VIB Department of Plant Biology' (Gent, Belgien, s. 2.14)) und pBAT-TL-GFP2 (Karsten Fischer, Tromsø, Norwegen). Die Vektoren pB2GW7 und pBAT-TL-GFP2 enthalten im Unterschied zum pBGW bereits den *35S CaMV*-Promotor sowie den NOS-Terminator.

pSAG13::HvS40-HA* und *p35S::HvS40-HA

Beide Transformationskonstrukte enthalten die kodierende Sequenz des *HvS40*-Gens, die am 3'-Ende mit einer Sequenz für einen HA-Tag (Hemagglutinin, Niman, 1983) versehen worden ist. Die Sequenz für den HA-Tag wurde mit dem Oligonukleotid 3'Tag S40 (s. 2.3, Tab. 2) an das 3'-Ende der *HvS40*-Sequenz angehängt. Das Produkt (*HvS40-HA*) aus der *HvS40*-Sequenz und dem *HA-Tag* wurde mit den Oligonukleotiden 5'Prom S40 und 3'Tag S40 amplifiziert und konnte anschließend mit den Endonukleasen *NcoI* und *KpnI* restringiert und in den HC345/S40-Klon ligiert werden (s.o). Dabei wurde das bereits klonierte *HvS40*-Gen durch das modifizierte *HvS40-HA*-Gen ausgetauscht. Der *SAG13*-Promotor wurde durch Hydrolyse mit den Endonukleasen *HindIII* und *NcoI* aus dem Vektor pSG761A (Dr. Amasino, Wisconsin, USA) gewonnen und in den Vektor HC345/S40-HA ligiert. Die entstandene Kasette *pSAG13::HvS40-HA::Tnos* sowie die *HvS40-HA*-Sequenz wurden dann mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe des Gateway-Systems in die Vektoren pBGW und pB2GW7 inseriert.

HvS40-GFP* und Δ PTP-*HvWhy1-GFP

Als weiterer Vektor für die Untersuchung der Lokalisation mittels GFP-Fusionen diene der binäre Gateway-Vektor pBAT-TL-GFP2, der einen doppelten *35S CaMV*-Promotor enthält. Er wurde zur Analyse der Gene *HvS40* und *HvWhy1* verwendet. Die kodierende Sequenz des *HvWhy1*-Gens stammte aus dem EST BF625136. Diese Sequenz repräsentiert nicht die vollständige cDNA, denn der 5'-Bereich fehlt. Die kodierende Sequenz des *HvS40*-Gens wurde aus dem genomischen „1 kb *HindIII*“-Klon (Haußühl 1998), der in der Arbeitsgruppe vorlag, mittels PCR amplifiziert (s. 2.3, Tab. 2) und mit Hilfe des Gateway-Systems kloniert (s. 2.5.3).

2.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.5.1 Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien

2.5.1.1 Anzucht und Lagerung

Für die Anzucht auf Festmedium werden transformierte Bakterienzellen oder Gefrierkulturen auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C (*Escherichia coli*) oder 28°C (*Agrobacterium tumefaciens*) inkubiert. Für die Flüssigkulturen werden einzelne Bakterienkolonien von einer LB-Agarplatte in ein Reagenzglas mit 4 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum übertragen und über Nacht bei 37°C bzw. 28°C im Schüttelinkubator (Innova™ 4400, Nürtingen) bei 180 rpm inkubiert. Die Kultivierung von *A. tumefaciens* kann auf LB-Medium oder auf YEB-Medium erfolgen.

LB-Medium

0,5 % [w/v]	Hefeextrakt
1,0 % [w/v]	NaCl
1,0 % [w/v]	Pepton aus Casein

LB-Agar

1,5 % [w/v]	Agar
in LB-Medium	

YEB-Medium (pH 7,4/NaOH)

0,5 % [w/v]	Rinderextrakt
0,1 % [w/v]	Peptone aus Casein
0,5 % [w/v]	Saccharose

Endkonzentrationen verwendeter Antibiotika

100 µg/ml	Ampicillin	35 µg/ml	Gentamycin
25 µg/ml	Kanamycin	50 µg/ml	Spectinomycin
20 µg/ml	Rifampicin		

Die Anlage einer Gefrierkultur erfolgte durch Anzucht einer Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Dazu wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 16000 $\times g$ zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415 D, Rotor F45-24-11, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde bis auf 500 µl entfernt, das Bakteriensediment resuspendiert und 250 µl 80 % [v/v] Glycerin hinzugefügt, mit der Bakterien-Lösung vermischt und die Suspension bei -80°C gelagert.

2.5.1.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

250 ml LB-Medium werden mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wird dann 30 min leicht schwenkend auf Eis gekühlt und durch eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 $\times g$ und 4°C (Centrikon T-124, Rotor A6.14, Kontron, München) sedimentiert. Nach Zugabe von 50 ml kalter 100 mM MgCl₂-Lösung wird das Sediment vorsichtig resuspendiert, nochmals zentrifugiert und anschließend vorsichtig in 50 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min unter leichtem Schwenken auf Eis und einer abschließenden Zentrifugation nimmt man die Zellen in 10 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung und 1,8 ml 100 % Glycerin auf. Die nun kompetenten Zellen werden in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation von 5 ng Plasmid oder 3 - 20 μ l eines Ligationsansatzes werden 100 μ l einer Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt. Dieses Gemisch inkubiert für 30 min auf Eis, wird für 1 min bei 43°C inkubiert, 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 500 μ l vorgewärmtem LB-Medium versetzt. Die Zellen wachsen für 50 min bei 120 rpm im Schüttelinkubator (37°C), werden dann auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (WTB Binder, Tüttlingen) inkubiert.

Verwendete *E. coli*-Stämme

DH5 α (Woodcock *et al.* 1989)

Library Efficiency® *DB 3.1*TM Cells (Invitrogen)

TOP10 ElectrocompTM Chemically Competent (Invitrogen)

2.5.1.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden die Bakterienstämme *GV3101* (Koncz und Schell 1986, Ti-Plasmid pMP90) oder *AGL1* (Ti-Plasmid pTiBo542) verwendet. Dazu wird eine Kolonie in 3 ml YEB-Medium bei 28°C unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika über Nacht angezogen. Die Übernachtskultur dient dem Animpfen einer 50 ml Kultur, die in 3 - 4 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,0 kultiviert wird. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1500 $\times g$ (4°C) wird der Überstand verworfen und das Sediment mit 10 ml kaltem 10 %igen [v/v] Glycerin gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1500 $\times g$, 4°C). Anschließend werden die Zellen in 1 ml kaltem 10 %igen [v/v] Glycerin resuspendiert und in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Transformation mittels Elektroporation wurde an der Anlage 'Bio-Rad Gene Pulser' (BioRad, München) durchgeführt. Dazu werden die elektrokompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut, und 50 μ l der Zellen vorsichtig mit 10 - 50 ng salzfreiem Plasmid gemischt und in vorge-

kühlte Küvetten (1 – 2 mm ‚gap sizes‘) gegeben. Die Elektroporation erfolgt für ca. 3 Sekunden bei einer Einstellung von 2,5 kV Volt, 25 µF Kapazität und 400 Ohm Widerstand. Anschließend wird die Suspension sofort mit 1 ml YEB-Medium (s. 2.5.1.1) versetzt, gut durchmischt und auf Eis gestellt. Nachdem der Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt ist, erfolgt eine Inkubation von 3 h bei 28°C in einem Schüttelinkubator. 100 - 200 µl des Ansatzes werden dann auf Selektionsplatten ausgestrichen und für 2 - 3 Tage bei 28°C inkubiert.

2.5.2 Isolierung von Plasmiden

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Dazu werden 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg), in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 min auf Eis zur Zelllyse inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Lösung II wird der Ansatz mehrmals vorsichtig invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 150 µl kalte Lösung III (3 M Natriumacetat, pH 4,8) hinzugefügt, für 5 min auf Eis gehalten und zentrifugiert (10 min, 16000 $\times g$). Der klare Überstand wird mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (10 min, 16000 $\times g$) sedimentiert. Im Anschluss erfolgen eine Waschung mit 70 % [v/v] Ethanol und eine Trocknung der Plasmid-DNA, die dann in 20 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen wird. Die in der Probe vorhandene RNA wird mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C verdaut. Die Plasmide können bei –20°C gelagert werden.

Bei der Isolierung von Plasmiden aus *A. tumefaciens*-Zellen wird der Überstand nach Zugabe der Lösungen I - III mit Phenol extrahiert (s. 2.5.7) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (s. 2.5.8).

Lösung I (pH 8,0)

25 mM	Tris/HCl pH 8,0
50 mM	Glukose
10 mM	EDTA

Lösung II

200 mM	NaOH
1 % [w/v]	SDS

1 x TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

2.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

Genspezifische DNA-Fragmente wurden entweder aus bereits klonierten Fragmenten mittels Restriktionsendonukleasen gewonnen oder konnten mit Hilfe von Oligonukleotiden aus cDNA oder Plasmiden mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Eine Standardligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l) von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bei 4°C über Nacht. PCR-Produkte wurden entweder direkt mit Restriktionsendonukleasen behandelt oder zunächst in den Vektor des ‚pGem®-T-Vector System I‘ nach Angaben des Herstellers ligiert (Promega, Mannheim).

Die Klonierung von DNA-Fragmenten konnte auch mit Hilfe des Gateway-Systems erfolgen. Diese Methode basiert auf homologer Rekombination definierter Fragmente. Dabei wurden die Produkte ‚pENTR™/D-TOPO Cloning Kit‘ und ‚Gateway®LR-Clonase™II Enzyme Mix‘ nach Angaben des Herstellers verwendet (Invitrogen, Karlsruhe). Die binären Zielvektoren des Gateway-Systems stammten von ‚VIB Department of Plant Biology‘ (Gent, Belgien, s. 2.14).

2.5.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. In der Regel besaßen die Restriktionsendonukleasen eine Konzentration von 10 U/ μ l (MBI Fermentas). Es wurden standardmäßig 3 - 5 U Enzym/ μ g zu verdauender DNA eingesetzt und bei 37°C für 2 - 3 h oder über Nacht inkubiert. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in Agarosegelen (s. 2.6.1).

2.5.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung wurden die ‚Proof-Reading-Polymerasen‘, ‚iProof High Fidelity‘ (BioRad, München) und die ‚Pfu‘-Polymerase (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die semiquantitative RT-PCR, in der cDNA als Matrize (s. 2.5.6) verwendet wird, erfolgte mit der Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l) von MBI Fermentas und dem PCR-Gerät ‚Primus 96 Plus‘ von MWG Biotech (Ebersberg) in einem 10 - 20 μ l Reaktionsansatz. Die ‚annealing‘-Temperatur (T_m) wurde der physikalischen Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide (s. 2.3, Tab. 3) angepasst, und betrug hier größtenteils 50°C. Die Elongationszeit wurde auf 1 min festgelegt, da alle zu amplifizierenden Produkte kleiner als 1 kb waren. Die Zyklenzahl variierte je nach Produkt (15 - 22 Zyklen für den internen Standard und 26 - 36 Zyklen für die zu untersuchenden Gene). Für die Amplifizierung des 18S-Transkripts, als interner Standard, wurde das ‚Quantum RNA Internal Standard Kit‘ von Ambion (Hamburg) verwendet.

2.5.4 Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des ‚Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kits‘ (MBI Fermentas) nach dem Kettenabbruch-Verfahren durchgeführt. Als Sequenzier-Oligonukleotide (s. 2.3, Tab. 6) dienten vektorspezifische Oligonukleotide, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert waren (MWG Biotech). Die Durchführung der Sequenzreaktion richtete sich nach den Herstellerangaben.

Die Ausführung des vorgeschriebenen Temperaturprogramms wurde im PCR-Gerät ‚Primus 96 Plus‘ (MWG Biotech) durchgeführt. Die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6 %, Rapid-Gel™ XL‘) am LI-COR DNA Sequencer 4000L (MWG Biotech, Ebersberg) über Nacht.

Die Sequenz der PCR-Produkte der semiquantitativen RT-PCR wurden nach einer Modifikation der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) in der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Schreiber (Universitätsklinikum, Kiel) überprüft. Hierfür wurde das ‚ABI PRISM™ Big Dye™- Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit‘ (Perkin Elmer) verwendet. 50 - 100 ng des PCR-Produktes wurden mit 1,6 pmol PCR-Oligonukleotid, 1 µl „BigDye™ Terminator Reaction Mix“ und ‚Ampli™ Taq FS‘ in einem Gesamtvolumen von 10 µl einer Sequenzreaktion unterworfen. Anschließend wurden die Proben über eine DyeEX®-Säule (Quiagen, Hilden) aufgereinigt, in eine ‚96-well-reaction-plate‘ (Micro-Amp® Optical, Perkin Elmer) überführt und auf einem ABI-PRISM® 3700 Kapillarsequenzierer (Perkin Elmer) analysiert.

2.5.5 Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

2.5.5.1 Isolierung genomischer DNA

Für den Einsatz von genomischer DNA in PCR-Reaktionen wurde pflanzliche DNA nach einem modifizierten Protokoll nach Edwards *et al.* (1991) isoliert.

Zwei Rosettenblätter von *A. thaliana* werden in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und nach Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer gründlich durchmischt. Um Proteine aus dem Extrakt zu entfernen, werden 150 µl einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 6,0) hinzugefügt und vorsichtig invertiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 12000 x g (Tischzentrifuge, Rotor A5-30-11, Eppendorf, Hamburg) werden 550 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert. Das Nukleinsäure-sediment wird mit 70 %igem [v/v] Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert (s. 2.5.2). Um vorhandene RNA zu entfernen, wird die DNA mit 1 µl RNase A

(10 mg/ml) versehen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Für eine PCR-Reaktion werden 1-3 µl eingesetzt. Die isolierte DNA kann für 2 Monate bei 4°C gelagert werden.

Extraktionspuffer

250 mM	NaCl
200 mM	Tris/HCl pH 7,5
25 mM	EDTA
0,5 % [w/v]	SDS

2.5.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit Boratpuffer

Für die Isolierung von sauberer RNA zur Verwendung für die semiquantitative RT-PCR wurde ein nach Sambrook *et al.* (1989) modifiziertes Protokoll ausgewählt. Dazu werden 200 - 600 mg Pflanzenmaterial durch Mörsern in flüssigem Stickstoff pulverfein zerkleinert. Das Pulver wird im noch gefrorenen Zustand in ein mit 800 µl Boratpuffer (65°C) und 600 µl Phenol gefülltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt, sofort gemischt und mittels Thermoschüttler für 20 min bei 30°C inkubiert. Die Phasen werden anschließend durch 10minütige Zentrifugation bei 12000 $\times g$ (Tischzentrifuge, Rotor A5-30-11, Eppendorf, Hamburg) getrennt und die obere Phase einer Phenolextraktion unterzogen (s. 2.5.7). Die daraus resultierende wässrige Phase wird mit einer 6 M Lithiumchlorid-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 2 M Lithiumchlorid versetzt. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgt bei 4°C über Nacht. Nach einer Zentrifugation (15 min, 12000 $\times g$, 4°C) und mehrmaligem Waschen der präzipitierten Nukleinsäuren mit 70 % [v/v] Ethanol erfolgt die Trocknung der gefällten RNA, die zuletzt in 20 - 30 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert wird.

Boratpuffer (pH 9,0)

200 mM	Natriumborat
30 mM	EGTA
1 % [w/v]	SDS

2.5.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA mit Trifast-Reagenz

Für eine schnelle Extraktion von RNA zur Verwendung für ‚Northern-Blot‘-Analysen wurde das Trifast-Reagenz von Peqlab Biotechnologie (Erlangen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Dazu werden 50-100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und mit 1 ml Trifast versetzt, gründlich durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend fügt man pro ml Trifast 200 µl Chloroform hinzu, schüttelt das Gemisch 15 Sekunden kräftig und inkubiert es für 5 min bei RT. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 12000 $\times g$ (Tischzentrifuge, Rotor A5-30-11, Eppendorf, Hamburg) erfolgt die Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und anschließend eine Vermischung mit 500 µl Isopropanol pro ml Trifast. Nach einer Inkubationszeit von 10 min (RT) sedimentiert die RNA durch eine Zentrifugation (10 min, 12000 $\times g$, 4°C). Der Überstand wird verworfen und die gefällte RNA zweimal mit 500 µl kaltem 70 %igen [v/v] Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die gefällte RNA kann nach Aufnahme in 30 µl sterilem Wasser bei -80°C gelagert werden.

2.5.6 Synthese von cDNA

Die für die reverse Transkription eingesetzte Gesamt-RNA (s. 2.5.5.2) wurde zuvor von restlicher DNA befreit, indem man die RNA mit RNase-freier DNaseI behandelte. Dazu wurde die gesamte RNA in einem 100 µl Ansatz nach Angaben des Herstellers (Fermentas) mit DNaseI behandelt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C mit einer anschließenden Ethanolpräzipitation (s. 2.5.8) und Aufnahme der RNA in sterilem Wasser.

Die Synthese von cDNA wurde mit Hilfe der ‚SuperScript II Reverse Transcriptase‘ nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wurden pro Reaktion 2 - 4 µg Gesamt-RNA und 250 ng Random-Primer (Promega) verwendet. Zur Entfernung restlicher RNA wurde der Ansatz nach der Synthese mit 2 U RNase H behandelt. Vor dem Einsatz der cDNA für die anschließenden PCR-Reaktionen wurde eine Verdünnung von eins zu fünf vorgenommen. Das einzusetzende Volumen an cDNA variierte je nach Effizienz der cDNA-Synthese. Zur Vergleichbarkeit der Proben wurden gleiche Mengen an cDNA mit Hilfe des internen Standards der 18SrRNA (Ambion) quantifiziert.

2.5.7 Phenolextraktion

Durch eine Extraktion mit Phenol können Proteine aus einer DNA- bzw. RNA-Probe herausgelöst werden. Die Nukleinsäuren werden dabei aufgereinigt. Dazu wird zu der Probe das gleiche Volumen Phenol gegeben, gemischt und für 10 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wird die wässrige obere Phase abgenommen und mit einem Volumen einer Phenol/Chloroform (1:1 [v/v]) Mischung versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wird mit einem Volumen Chloroform wiederholt. Die dann im Überstand befindlichen Nukleinsäuren werden mit Ethanol präzipitiert (s. 2.5.8).

2.5.8 Fällung von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren wurde standardmäßig mit Ethanol durchgeführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 4 M NaCl-Lösung und dem 2,5 fachen Volumen an kaltem 100 %igem Ethanol wurden die Nukleinsäuren für 30 min bei -80°C gefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, $16000 \times g$, 4°C) wurden die gefällten Nukleinsäuren mit kaltem 70 %igen [v/v] Ethanol gewaschen, abzentrifugiert, luftgetrocknet und in einem beliebigen Volumen an sterilem Wasser oder 1 x TE-Puffer (s. 2.5.2) aufgenommen.

2.5.9 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nach geeigneter Verdünnung der Nukleinsäurelösung wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm photometrisch am ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) gemessen. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml und einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Unter Verwendung von ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen (s. 2.6.1) ist die Nukleinsäurekonzentration bestimmbar, indem definierte Mengen der Probe und ggf. des 'Lambda-Markers' (100 ng/µl) aufgetragen werden. Anhand der Intensität der unter UV-Licht leuchtenden Banden kann die Konzentration abgeschätzt werden. Zur Abbildung der Auftrennung fand die Videodokumentationsanlage (MultiimageTMLight Carbinet, Alpha Innotech Corporation) von Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf) Verwendung.

2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen

2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und dem Sichtbarmachen von Nukleinsäuren. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente kann die Agarosekonzentration und damit die Porengröße variiert werden. Für Nukleinsäuren mit einer Größe von 0,5 bis 5 kb wurde 0,75 % [w/v] Agarose verwendet. Fragmente bis 0,5 kb wurden in einem 2 %igen [w/v] Gel aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA fügte man der Gellösung 0,04 % [v/v] Ethidiumbromid hinzu. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer und als Auftragspuffer 0,1 Volumen 10 x BPB-Farblösung verwendet.

<u>10 x BPB-Farblösung</u>		<u>50 x TAE-Puffer</u>	
50 % [v/v]	Glycerin	2 M	Tris
0,1 % [w/v]	Bromphenolblau	50 mM	EDTA/NaOH pH 8,0
		5,71 % [v/v]	Eisessig

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das zu eluierende Fragment aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels des ‚Nucleo Spin Extract II Kit‘ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers in sterilem Wasser eluiert.

2.6.2 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurde eine denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für die qualitative und quantitative Überprüfung isolierter Gesamt-RNA wurden nach Quantifizierung mittels photometrischer Messung gleiche Mengen der RNA mit RNA-Auftragspuffer (mit Ethidiumbromid) versetzt und für 3 h bei 60 V im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt.

Für den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran Hybond N+ (Amersham Pharmacia, Freiburg) wurden 15 µg der RNA, die in RNA-Auftragspuffer ohne Ethidiumbromid gelöst war, verwendet (s. 2.8.1). Die Auftrennung erfolgte bei 15 V über Nacht. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer.

Formaldehyd-Agarosegel

1 % [w/v]	Agarose
20 % [v/v]	Formaldehyd
in 1 x MOPS-Puffer	

10 x MOPS-Puffer

400 mM	MOPS
100 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA

RNA-Auftragspuffer

40 % [v/v]	Formamid, deionisiert
20 % [v/v]	10 x BPB-Farblösung
5 % [v/v]	Formaldehyd
(0,75 % [v/v]	Ethidiumbromid)
in 1 x MOPS-Puffer	

2.6.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Proteinkomplexen (s. 2.11.2) wurde mittels nativer Gelelektrophorese in Maxigelkammern (160 x 190 x 1 mm, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 4 % [v/v] Acrylamidgele nach dem Standardprotokoll für Gelretardierungsexperimente von Promega (Mannheim) verwendet:

10 x TBE Puffer (pH 8,3)	2,5 ml
37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid (40 % [w/v])	3,125 ml
40 % [w/v] Acrylamid	1,875 ml
80 % [v/v] Glycerin	1,563 ml
steriles Wasser	40,50 ml
10 % [w/v] APS	375 µl
TEMED	25 µl

10 x TBE (pH 8,3)

890 mM	Tris
890 mM	Borsäure (pH Wert Justierung)
20 mM	EDTA

Die Polymerisierung der Gelmatrix erfolgte für 3 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C. Nach einem Vorlauf des Gels (10 min, 300 V) wurde die Elektrophorese bei 300 V und RT für 1,5 h durchgeführt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Das Gel trocknete man nach der Elektrophorese auf einem ‚Phero-Temp 60-Geltrockner‘ (Biotech-Fischer, Reiskirchen) für 1 h bei 75°C. Die Exposition erfolgte je nach Reaktionsansatz über Nacht oder für eine Woche in Autoradiographiekassetten auf einem Hyperfilm™MP (Amersham Biosciences, GB) bei -80°C. Die Entwicklung des Films wurde wie in Abschnitt 2.9 beschrieben, durchgeführt.

2.6.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970). Hierbei wurden die Proteine zunächst in einem 5 %igen Sammelgel (pH 6,8) fokussiert und anschließend in einem Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt. Die Prozentigkeit des Trenngels steht in Abhängigkeit zu dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Für kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 - 30 kD wurde ein 14 - 16 %iges Trenngel verwendet, während größere Proteine auf einem niederprozentigen Gel eine bessere Auftrennung erfahren. Die Proteinproben wurden zuvor mit einem Volumen 2 x PSB versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 4°C und 25 mA pro Minigel einer Größe von 80 x 85 x 1 mm (Biometra, Göttingen). Als Laufpuffer diente 1 x Laemmli-Puffer. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde der ‚Prestained-Protein-Ladder‘ (10 - 180 kD, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

2 x PSB

100 mM	Tris/HCl pH 6,8
100 mM	DTT
20 % [v/v]	Glycerin
4 % [w/v]	SDS
0,2 % [w/v]	Bromphenolblau

10 x Laemmli-Puffer

250 mM	Tris/HCl pH 6,8
1,9 M	Glycin
1 % [w/v]	SDS

2.6.5 Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

In Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine können durch Anfärbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau angefärbt werden. Dazu wurden die Gele für 1 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Farbintensität in einer Entfärberlösung, die sich aus der Färbelösung ohne Coomassie zusammensetzt, geschwenkt.

Färbelösung

25 % [v/v]	Isopropanol
10 % [v/v]	Essigsäure
0,1 % [w/v]	Coomassie Brilliantblau R250

2.6.6 Trocknung von Proteingelen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden gefärbte Polyacrylamidgele (s. 2.6.5) zwischen Einmachfolien getrocknet. Dazu schwenkte man das Gel für 2 h in einer 2 %igen [v/v] Glycerinlösung und spannte das Gel anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Einmachfolie (DETI GmbH, Meckesheim). Die Trocknung fand für 2 -3 Tage bei RT statt. Die nativen Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe eines Geltrockners auf Whatmanpapier getrocknet (s. 2.6.3).

2.7 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch den Einbau von radioaktiv markiertem α - ^{32}P -dCTP. Es wurde das ‚HexaLabel™DNA Labeling Kit‘ (MBI Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G50 in einer silanisierten Pasteurpipette durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989).

2.7.2 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die radioaktive Phosphorylierung von Oligonukleotiden, die für die Gelretardierungsexperimente verwendet wurden (s. 2.3 Tab. 5 und 2.11.2), erfolgte mit Hilfe von radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP und einer T4-Polynukleotid-Kinase nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas). Zur Erzeugung von doppelsträngigen Fragmenten wurden äquimolare Mengen an Oligonukleotiden vor der Markierung denaturiert (5 min, 95°C) und durch langsames Abkühlen miteinander hybridisiert. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 40 pmol pro Markierung eingesetzt und anschließend durch eine Gelfiltration (Micro Spin™ G25 Säule, Amersham GE Healthcare, Freiburg) von nicht eingebauten Nukleotiden befreit. Um die Effizienz der radioaktiven Markierung sowie die verfügbare Menge an markierter DNA zu bestimmen, wurde 1 µl des gereinigten Ansatzes in 2,5 ml Scintillationscocktail (Rotiscint, Roth, Karlsruhe) in einem Scintillationszähler (PW4700, Philips, Niederlande) gemessen.

2.8 Immobilisierung von Makromolekülen auf Membranen

2.8.1 Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA über Formaldehyd-Agarosegele (s. 2.6.2) wurden die RNA-Proben durch Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran Hybond N+ (Amersham Pharmacia, Freiburg) übertragen (Sambrook *et al.* 1989). Der Transfer fand unter Verwendung einer 20 x SSC-Lösung über Nacht statt. Die RNA-Fixierung auf der Membran erfolgte anschließend durch Backen der Membran bei 80°C für 2 h. Die erfolgreiche Auftrennung der aufgetragenen Probenmengen wurde durch eine Färbung mit einer Methylengrünlösung überprüft. Dazu wurde die Membran für 15 min in 5 % [v/v] Essigsäure äquilibriert und anschließend für 15 min in der Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit sterilem Wasser.

20 x SSC-Lösung

3 M	NaCl
300 mM	Na-Citrat/HCl pH 7,0

Methylengrünlösung

500 mM	NaAc/NaOH pH 5,2
0,004 % [w/v]	Methylengrün

2.8.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach der SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (s. 2.6.4) auf eine PVDF-Membran (Machery-Nagel, Düren) transferiert. Dazu äquilibriert man das Gel für 5 - 10 min in Kathodenpuffer. Die PVDF-Membran wird für einige Sekunden mit Methanol aktiviert und anschließend für 10 min in sterilem Wasser inkubiert, bevor sie im Anodenpuffer äquilibriert wird. Der Transfer erfolgte ‚semi-dry‘ über die Elektro-Blot-Apparatur („Fastblot“, Biometra, Göttingen) für 1,5 - 2 h bei 4°C und einer Stromstärke von 0,65 mA/cm² Gel. Zur Überprüfung des Transfers wurden die auf der Membran immobilisierten Proteine mit einer Ponceau-Lösung (0,2 % [w/v] Ponceau-S, 3 % [w/v] Trichloressigsäure) angefärbt, indem die Membran für 10 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit sterilem Wasser entfärbt wurde.

<u>Kathodenpuffer</u>		<u>Anodenpuffer</u>	
150 mM	Glycin	150 mM	Glycin
20 mM	Tris	20 mM	Tris
0,1 % [w/v]	SDS	30 % [v/v]	Methanol

2.9 Hybridisierung immobilisierter RNA mit DNA-Sonden

Für die Hybridisierung von RNA-Membranen (s. 2.8.1) wurden die mit α -³²P-dCTP markierten DNA-Fragmente (s. 2.7.1) eingesetzt. Vor der Hybridisierung wurde die Membran für 3 h bei 65°C in einer Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit ca. 750.000 cpm markierter DNA/ml Hybridisierungslösung bei 65°C über Nacht. Um nicht-spezifisch gebundene DNA zu entfernen, wurde die Membran nach der Hybridisierung bei 65°C nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia, Braunschweig) gewaschen.

Prähybridisierungs-/Hybridisierungslösung

5 % [w/v]	Dextransulfat
1 % [w/v]	SDS
0,75 M	NaCl
0,1 Volumen	DNA aus Sperma des Herings (10 mg/ml)

Die hybridisierten RNA-Membranen wurden in eine Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolien (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) überführt und bei -80°C auf einem Hyperfilm™MP von Amersham Pharmacia exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme mit der Entwicklerlösung Roenteroll HC (Tetenal, Norderstedt) und der Fixierlösung MRP Superfix Plus (Tetenal, Norderstedt) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.10 Extraktion von Proteinen

2.10.1 Überexpression und Isolierung rekombinanter Proteine aus *E. coli*-Zellen

Die Sequenz des zu analysierenden *HvS40*-Gens wurde in den Überexpressionsvektor pet14b (Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt) kloniert und im Überexpressionstamm *BL21* exprimiert. Dafür wurde die kodierende Sequenz des *HvS40*-Gens als *NcoI/Eco81I*- Fragment aus dem „1 kb *HindIII*“-Klon (Haußühl 1998) ‚blunt-end‘ in die *XhoI*-Schnittstelle des Vektors pet14b ligiert. Aufgrund der Klonierung besitzt das überexprimierte HvS40-Protein ein Molekulargewicht von 20 kD. Die vorliegende Sequenz des *HvWhy1*-Gens (EST BF625136) wurde in den pQE30-Vektor (Quiagen, Hilden) kloniert und im Überexpressionstamm *SG13009* exprimiert (Evelyn Grabowski, AG Krupinska).

Für die Überexpression wurden 4 ml einer Übernachtskultur zu 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben und die Kultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Zur Induktion der Expression der rekombinanten Proteine wurde Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Kultur für weitere 2 - 5 h angezogen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (4000 \times g, 20min) der Kultur. Das Bakterien-Sediment wurde bis zur Isolierung bei -20°C gelagert.

Die Isolierung und damit Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus den Bakterien wurde nach Angaben des Herstellers (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Ni-NTA-Chromatographie für 6 x His-getaggte Proteine. Die Isolierung und Aufreinigung der Proteine HvWhy1 und HvS40 fand unter nativen Bedingungen statt. Das überexprimierte HvWhy1-Protein wurde nach Aufreinigung dialysiert und durch Gefriertrocknung ankonzentriert (Evelyn Grabowski, AG Krupinska).

2.10.2 Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von nativen Proteinen aus Pflanzenmaterial wurden 200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer wurde das Material mit einem Pistill gründlich zerrieben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 12000 $\times g$) wurde der Überstand, der die Proteine enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

Extraktionspuffer

0,5 x	TBE (pH 8,3), (s. 2.6.3)
50 mM	β -Mercaptoethanol
80 µM	MG132 (Merck, Darmstadt)
¼ Tablette/12 ml	Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

2.10.3 Isolierung von Kernproteinen

Die Isolierung von nativen Kernproteinen aus Rosettenblättern von *A. thaliana* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Desveaux *et al.* (2004). Dazu wurden 500 mg Material in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerkleinert, in 1 ml Puffer C homogenisiert und anschließend durch Miracloth (Merck, Darmstadt) filtriert. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 16000 $\times g$ und 4°C (Tischzentrifuge, Rotor A5-30-11, Eppendorf, Hamburg) wurde das Sediment, das Kerne und Plastiden enthielt, mit 1 ml Puffer C+ versetzt und gründlich mit einem Pinsel resuspendiert. Zur Lyse der Plastiden enthielt der Puffer C+ zusätzlich 1 % [v/v] NP-40. Die Zugabe von Puffer C+ wurde nach einer Zentrifugation (16000 $\times g$, 5 min, 4°C) wiederholt durchgeführt. Die angereicherten Kerne wurden in 1 ml Puffer Q äquilibriert und erneut zentrifugiert. Abschließend nahm man die Kerne in 50 - 150 µl Puffer Q auf. Bei Bedarf wurden die Kerne mit Hilfe von Ultraschall aufgebrochen. Dies geschah in einem Sonopuls (UW2070 Bandelin, Berlin) für 6 x 8 Sekunden bei 30 % Intensität mit einer anschließenden Inkubation für 30 min auf Eis. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 16000 $\times g$ und 4°C wurde der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

Puffer C

0,33 M	Saccharose
10m M	NaCl
10m M	MES/NaOH pH 5,2
10m M	DTT
1m M	EDTA
80 µM	MG132 (Merck, Darmstadt)
¼ Tablette/12 ml	Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

Puffer Q

200 mM	NaCl
20 mM	HEPES/KOH pH 8,0
1,5 mM	MgCl ₂
0,2 mM	EDTA
80 µM	MG132
¼ Tablette/12 ml	Protease Inhibitor Cocktail

2.10.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (1976) wurden 5 - 10 µl des Proteinextraktes auf 800 µl mit Wasser aufgefüllt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad Nanoquant-Protein-Assay) versetzt und gut durchmischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichreihe berechnet.

2.11 Proteinanalyse

2.11.1 Phosphorylierungsanalyse von Proteinen

Zur Untersuchung, ob Proteine phosphoryliert werden können, wurde 1 - 100 ng überexprimiertes nativ aufgereinigtes Protein in einem 12 µl Ansatz mit 1 x Kinasepuffer und γ -³²P-ATP versetzt. Nach Zugabe von 10 U Protein Kinase A (5 U/µl, Sigma) inkubierte der Ansatz für 30 min bei 30°C. Als Kontrolle zur Autophosphorylierung wurde in einem parallelen Ansatz auf die Zugabe der Kinase verzichtet. Als negative Kontrolle fand BSA unter Einsatz gleicher Konzentration statt. Die phosphorylierten Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 2.6.4) und getrocknet (s. 2.6.6). Die Exposition erfolgte in einer Autoradiographiekassette auf einem Hyperfilm™MP (Amersham Pharmacia) bei Raumtemperatur. Die Entwicklung des Films wurde, wie in Abschnitt 2.9 beschrieben, durchgeführt.

5 x Kinasepuffer

500 mM	Tris/HCl pH 8,0
200 mM	KCl ₂
25 mM	MgCl ₂
10 mM	CaCl ₂
2,5 mM	DTT
2 mM	EDTA

2.11.2 DNA-Protein-Bindereaktion

Für die DNA-Protein-Bindereaktion wurde sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA eingesetzt (s. 2.3 Tab. 5 und 2.7.2). Um stets die gleiche Effizienz der Bindereaktion zu erzielen, wurden alle Lösungen in kleinen Mengen bei -20°C gelagert und nach einmaliger Verwendung verworfen. Die Reaktion wurde in 1 x Bindepuffer durchgeführt. Dabei wurden 200 ng überexprimiertes, aufgereinigtes Protein (s. 2.10.1) und 100.000 cpm markierte DNA (1 - 2,5 pmol) eingesetzt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen enthielt ein Ansatz 4 µg Poly-(dl-dC). Die Reaktion inkubierte für 1 h bei 25°C. Für Kompetitionsansätze wurde dem Reaktionsansatz die 50 fache Menge an unmarkierter spezifischer DNA oder eine äquimolare Menge unmarkierter unspezifischer DNA zugefügt und vor Zugabe der markierten DNA für 15 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 x Beladungspuffer versehen und vollständig für die native Gelelektrophorese eingesetzt (s. 2.6.3).

5 x Bindepuffer

250 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
5 mM	MgCl ₂
2,5 mM	EDTA
2,5 mM	DTT
20 % [v/v]	Glycerin

10 x Beladungspuffer

250 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
40 % [v/v]	Glycerin
0,2 % [w/v]	Bromphenolblau

2.11.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Nachweis von auf eine Membran immobilisierten Proteinen (s. 2.8.2) erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dazu wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierlösung (4 % [w/v] Milchpulver in 1 x PBST) bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe mit 1 x PBST (2 x kurz, 1 x 15 min, 2 x 5 min). Der Primärantikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet war, wurde in einer für den jeweiligen Antikörper geeigneten Verdünnung in 0,5 % [w/v] Blockierlösung angesetzt und für 2 - 4 h mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran, wie oben beschrieben, gewaschen. Der Nachweis des primären Antikörpers erfolgte mit einem spezifischen Sekundärantikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt war. Die Membran wurde für 45 min mit einer für den jeweiligen Antikörper geeigneten Verdünnung in 1 % [w/v] Blockierlösung inkubiert. Nachdem die Membran in 1 x PBST gewaschen wurde (2 x kurz, 1 x 15 min, 4 x 5 min), erfolgte der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes mit Hilfe der ‚Luminogen™TMA-6‘ Lösungen durch Chemilumineszenz nach Angaben des Herstellers (Amersham GE Healthcare).

10 x PBST (pH 7,4)

1370 mM	NaCl
100 mM	Na ₂ HPO ₄
27 mM	KCl
20 mM	KH ₂ PO ₄
0,001 % [v/v]	Tween 20

Zum immunologischen Nachweis des HvS40-Proteins wurde ein Sulfolink-aufgereinigter Anti-HvS40-Antikörper (AG Krupinska, Pierce Biotechnology, Bonn) verwendet, der gegen das über-exprimierte Protein gerichtet ist. Zum Nachweis des HvS40-HA-Fusionsproteins wurde der ,Anti-HA High Affinity rat monoclonal antibody [clone 3F10]' (Roche, Mannheim) eingesetzt. Der Anti-HA erkennt das Epitop YPYDVPDYA des HA-Tags. Die Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper waren zum einen der ,ECL Anti-rabbit IgG HRP-Linked Species-Specific Whole Antibody' (GE Healthcare, München) und zum anderen der ,Peroxidase- conjugated Affini Pure Goat Anti-Rat IgG' (Dianova, Hamburg).

Tab. 7 Auflistung der Antikörper unter Angabe der verwendeten Verdünnung.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-HvS40	1:5000	Anti-rabbit	1:50000
Anti-HA	1:1500	Anti-rat	1:10000

2.12 Transformation von Pflanzen

2.12.1 Biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen

5 µg des zu untersuchenden Plasmids wurden zu 2 mg Goldlösung (Größe 1,5 - 3 µm) gegeben und gut durchmischt. Die Bindung des Plasmids an die Oberfläche der Goldpartikel erfolgte durch die zeitgleiche Zugabe von 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin mit sofortiger Durchmischung für 1 - 2 min. Nach einer Zentrifugation von 30 Sekunden bei 2300 x g wurde das Sediment mit 250 µl 100 %igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Den sedimentierten Goldpartikelansatz resuspendierte man in 50 µl 100 %igem Ethanol. Ein Goldpartikel-ansatz wurde auf fünf Schüsse (10 µl/Schuss) aufgeteilt. Der Beschuss vitaler, auf MS-Medium gebetteter Epidermiszellen von Frühlingszwiebeln erfolgte in einer biolistischen Anlage (Model PDS-1000/He, Bio-Rad, München) mit einem Druck von 1100 oder 1350 psi. Die Zwiebelepidermiszellen wurden anschließend für 24 - 48 h im Dunkeln bei einer Temperatur von 26°C inkubiert.

Die Auswertung der Experimente erfolgte entweder am Axiophot (Zeiss) oder an einem Konfokalen Mikroskop (CLSM, Typ TCS SP von Leica, Heidelberg) unter Verwendung eines Ar/He/Ne-Ionenlasers. Das GFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission in einem Wellenlängenbereich von 510 - 550 nm gemessen.

MS-Platten (pH 5,8/KOH)

1,5 % [w/v] Agar

in 1 x MS-Medium (M0245, Duchefa)

Auf die Zugabe von Saccharose wurde verzichtet, da dies im Hinblick auf die Vitalität der Zwiebelepidermiszellen nicht erforderlich war.

2.12.2 Transformation von Gerste

Die stabile Transformation der Gerstensorte *Hordeum vulgare* L. cv. ‚Golden Promise‘ wurde in Kooperation mit den Laboren von Professor Diter von Wettstein (Washington State University, USA) und Dr. Jochen Kumlehn (IPK, Gatersleben) durchgeführt. Da die Transformation nicht von mir selbst vorgenommen wurde, wird auf die detaillierte Beschreibung der Methode im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Sie basiert auf der Kokultivierung von unreifen Embryonen mit *Agrobacterium tumefaciens* des hypervirulenten Stammes *AGL1* (Lazo *et al.* 1991) und wurde als effiziente Methode zur Transformation von Gerste beschrieben (Tingay *et al.* 1997, Hensel und Kumlehn 2004, Hensel *et al.* 2007). Dabei werden die Embryonen mit den Agrobakterien, die den zu transformierenden binären Vektor enthalten, für maximal 3 Tage kokultiviert. Die infizierten Embryonen bilden dann über mehrere selektive Regenerationsprozesse nach 3 - 5 Wochen Kalli, die nach weiteren zwei Wochen zu ergrünen beginnen und Sprosse bilden. Nach Anregung des Wurzelwachstums regenerieren die Sprosse letztendlich zu transgenen Pflanzen.

2.12.3 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* Col-0 wurde nach der ‚Floral Dip‘-Methode (Clough und Bent 1998) durchgeführt. Dazu wurden die bereits mit dem Plasmid transformierten Agrobakterien des Stammes *GV3101* in 25 ml YEB-Medium (s. 2.5.1.1), das das entsprechende Antibiotikum enthielt, für 2 Tage bei 28°C angezogen. 10 ml dieser Vorkultur dienten zum Animpfen einer 500 ml Kultur. Die Bakterien wurden am folgenden Tag sedimentiert (5500 x g, 15 min, RT) und bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 in Inokulationsmedium aufgenommen.

Die verwendeten Pflanzen hatten einen Blütenstand von 10 - 25 cm Höhe und viele kleine geschlossene Blütenknospen. Die Pflanzen wurden vor der Inokulation gründlich gewässert. Das mit Agrobakterien versetzte Inokulationsmedium wurde in einem Becherglas ständig gerührt, damit die Agrobakterien nicht sedimentierten. Die Blütenstände der Pflanzen tauchte

man vollständig für 3 - 5 Sekunden leicht schwenkend in die Suspension. Anschließend wurden die Pflanzen für 12 - 24 h mit Plastiktüten abgedeckt und im Dunkeln oder bei Schwachlicht gehalten, bevor sie erneut den alten Anzuchtbedingungen ausgesetzt wurden. Je nach Anzucht konnten nach 6 - 8 Wochen die Samen geerntet und bei 4°C gelagert werden.

Inokulationsmedium (pH 7,5/KOH)

44 nM	6-Benzylaminopurin
5 % [w/v]	Saccharose
0,005 % [v/v]	Silwet L-77
in ½ MS-Medium (M0245, Duchefa)	

2.12.4 Transformation von Kartoffelprotoplasten

2.12.4.1 Isolierung von Protoplasten aus Kartoffelblättern

Für die Isolierung von Protoplasten nach Nagy und Maliga (1976) wurden 5 - 7 Wochen alte Kartoffelblätter der Sorte ‚Baltica 809‘ aus der Gewebekultur und steril filtrierte frische Lösungen verwendet. Es wurden 2 - 3 abgeschnittene Blätter zügig in einer Petrischale (Ø 9 cm) mit 15 ml CPWM-Enzymlösung vorsichtig mit einem Skalpell in 1 - 2 mm breite Streifen zerschnitten und für 14 - 18 h bei 24 - 26°C im Dunkeln inkubiert. Am folgenden Tag lösten sich durch leichtes Schwenken für mindestens 1 h die Protoplasten aus dem Gewebe. Die Lösung wurde vorsichtig und langsam mit einer Glaspipette mit weiter Öffnung abgenommen, in ein Plastikröhrchen überführt und für 5 min zentrifugiert (63 x g, swing-out Rotor, Eppendorf). Die sedimentierten Protoplasten wurden vorsichtig in 10 ml W5-Lösung aufgenommen und die Anzahl der Protoplasten pro ml in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer (Roth) bestimmt. Zur Berechnung der Zellen pro ml bestimmte man die Anzahl der Zellen pro Großquadrat (Fläche [mm²] x Kammer-tiefe [mm]) der Zählkammer. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte somit die Anzahl der Protoplasten pro ml berechnet werden. Die Integrität der Protoplasten wurde überprüft und der Anteil intakter Protoplasten abgeschätzt.

CPWM-Lösung (pH 5,6/KOH)

395 mM	Mannitol
10 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
5 mM	MES
1 mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
1 mM	KNO ₃
0,2 mM	KH ₂ PO ₄
1 % [w/v]	PVP10

CPWM-Enzymlösung

0,5 % [w/v]	Cellulase R10
0,15 % [w/v]	Mazerozym R10
in CPWM-Lösung	

W5-Lösung (pH 5,8/KOH)

154 mM	NaCl
125 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
5 mM	KCl ₂
5 mM	Glucose

2.12.4.2 Transformation von Kartoffelprotoplasten mittels PEG

Für die transiente Transformation wurden 10⁶ Protoplasten in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min zentrifugiert (72 x g, swing-out Rotor, Eppendorf). Die Protoplasten-Suspension wurde in 10 ml 1 x Mannitol-Lösung äquilibriert und nochmals zentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 500 µl 1 x Mannitol-Lösung gemischt und für 5 min einem Hitzeschock bei 45°C unterzogen. Nach anschließender Inkubation (5 min bei RT) fügte man 50 µg Plasmid (1 µg/µl) hinzu und mischte vorsichtig. Die Zugabe von 500 µl PEG-Lösung führte zu einer Verklumpung der Protoplasten, die durch gründliches, aber vorsichtiges Mischen zu beheben war. Der Ansatz inkubierte für 25 min bei RT. Die Protoplasten wurden durch langsames Hinzufügen in mehreren Schritten mit insgesamt 5 ml W5-Lösung vermischt und zentrifugiert (5 min, 72 x g). Abschließend erfolgte eine Aufnahme der Protoplasten in 10 ml K3AS-Medium. Die Suspension wurde über Nacht bei 22 - 24°C im Dunkeln in Schräglage inkubiert.

2 x Mannitol-Lösung (pH 6,5/KOH)

800 mM	Mannitol
30 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
0,2 % [w/v]	MES

K3AS-Medium (pH 5,8/KOH)

400 mM	Saccharose
3 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
1,6 mM	D-Xylose
22 µM	6-Benzylaminopurin
107 µM	1-Naphthalen-Essigsäure
in 1 x MS (M0231, Duchefa)	

PEG-Lösung (pH 5,6 - 7,0/KOH)

40 % [w/v]	Polyethylenglykol 6000
in 1 x Mannitol-Lösung	

2.13 Färbemethoden

2.13.1 GUS-Färbung

Zur subzellulären Lokalisation von β -Glucuronidase-Fusionsproteinen wurde ein colorimetrischer Nachweis durchgeführt. Dazu wurden die Zwiebelepidermiszellen 24 h nach transienter Transformation von den MS-Platten in die GUS-Färbelösung überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine wurde an einem Zeiss Axiophot (Jena, Germany) analysiert.

<u>GUS-Färbelösung</u>		<u>Natriumphosphatpuffer (1 M, pH 7,0)</u>	
5 mM	Kaliumferricyanid	57,7 ml	1 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
5 mM	Kaliumferrocyanid	42,3 ml	1 M Na H ₂ PO ₄ x H ₂ O
1 mM	X-GlcA		
0,1 % [v/v]	Triton X-100		
in 200 mM Natriumphosphatpuffer			

2.13.2 Färbung von Mitochondrien

Für die Vitalfärbung von Mitochondrien wurde das Präparat in einer 100 nM Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs 'MitoTracker Orange' (CM-H2TMRos, Molecular Probes) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Analyse am Konfokalen Mikroskop (CLSM, Typ TCS SP von Leica, Heidelberg) erfolgte nach einer Anregung bei einer Wellenlänge von 554 nm und bei einer Emission von 576 nm.

2.14 Datenbanken

Internetadresse	Beschreibung
http://bbc.botany.utoronto.ca	efp-Browser, The Botany Array Resource and other Arabidopsis Functional Genomics Tools
http://clustalw.genome.ad.jp	ClustalW, Analyse multipler Sequenzen
http://expasy.org	PROSITE, Proteinanalysen
http://pgrc.ipk-gatersleben.de	IPK, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
http://psort.nibb.ac.jp	iPSORT, Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen
http://scansite.mit.edu	Suche nach Motiven in Proteinsequenzen
http://signal.salk.edu	SALK- Institute Genomic Analysis Laboratory
http://sun1.softberry.com	PROTCOMP Version 6.1, Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen
http://www.at.embnet.org	PESTfind, National EMBnet Node Austria
http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/	Promotoranalyse
www.arabidopsis.org	TAIR (The Arabidopsis Information Resource)
www.cbs.dtu.dk	CBS, Center for Biological Sequence Analysis, TargetP, NetPhos, NetNES, PredictNLS
www.gabi-kat.de	Max Planck Institut für Züchtungsforschung (Köln), GABI-Kat Projekt
www.plantgenetics.rug.ac.be	VIB Department of Plant Biology, Gateway-Vektoren

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des HvS40-Proteins

Das *HvS40*-Gen besteht aus einem einzigen Exon, das eine kodierende Sequenz von 418 bp umfasst. Das Protein besitzt 138 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 15,4 kD. Es handelt sich um ein lösliches basisches Protein (isoelektrischer Punkt 9,2), das trotz des kleinen Molekulargewichts zwei Kernlokalisationssignale („bipartite nuclear localization signal“, NLS) aufweist (Krupinska *et al.* 2002). Um weitere Hinweise zur Funktion des HvS40-Proteins zu erlangen, wurden Analysen zur Charakterisierung des HvS40-Proteins durchgeführt. Im Folgenden wird auf eine computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz eingegangen und anschließend werden einige Eigenschaften des Proteins experimentell untersucht. Abschließend wird in diesem Kapitel die Verwandtschaft des HvS40-Proteins zu anderen Proteinen analysiert.

3.1.1 Analyse der Aminosäuresequenz

Das HvS40-Protein verfügt neben den NLS-Sequenzen über weitere funktionelle Eigenschaften, die hier kurz beschrieben werden sollen. Mit Hilfe der Programme ‚ScanProsite‘ und ‚NetPhos. 2.0‘ (s. 2.14) konnten mehrere hypothetische Phosphorylierungsstellen vorhergesagt werden, die durch die Aminosäuren Serin und Threonin ausgezeichnet sind (Abb. 6). Das Programm ‚NetNES 1.1‘ sagt zusätzlich voraus, dass das HvS40-Protein eine hypothetische Kernexportsequenz („nuclear export sequence“, NES) zwischen den Aminosäuren 122-130 im C-terminalen Bereich besitzt. Diese NES-Sequenz, die charakteristisch für ‚Shuttle‘-Proteine ist, setzt sich aus hydrophoben Aminosäuren, vorzugsweise Leucinen, zusammen, die in definiertem Abstand zueinander angeordnet sind (Abb. 6). Die HvS40-Sequenz besitzt eine Kernexportsequenz, die der NES-Konsensus-Sequenz **L-X (2or3)-[LIVFM]-X (2or3)-L-X- [LI]** entspricht (Bogerd *et al.* 1996).

Mit Hilfe des Programmes ‚PESTfind‘ (s. 2.14) konnte zwischen den Aminosäuren 36 bis 51 eine hypothetische PEST-Sequenz vorhergesagt werden. Sie wird charakterisiert durch eine Region, die mit den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) angereichert ist (Abb. 6). Diese Sequenz kommt häufig in Proteinen vor, die eine sehr kurze Lebensdauer besitzen (Rechsteiner und Rogers 1996). Der Abbau dieser Proteine erfolgt über die ubiquitin-abhängige Proteolyse. Die Wahrscheinlichkeit für eine derartige funktionelle PEST-Sequenz in dem HvS40-Protein wurde jedoch als gering definiert.

Es konnten in der Aminosäuresequenz des HvS40-Proteins keine DNA-Bindedomänen oder Aktivierungsdomänen, die typisch für Transkriptionsfaktoren sind, gefunden werden. Die Aminosäuresequenz des HvS40-Proteins besitzt konservierte Bereiche, die charakteristisch sind für Proteine der DUF584-Familie, auf die in Abschnitt 3.1.4 näher eingegangen wird. Im Nachfolgenden sind zunächst die Ergebnisse zur Analyse der vorhergesagten Eigenschaften des HvS40-Proteins aufgeführt.

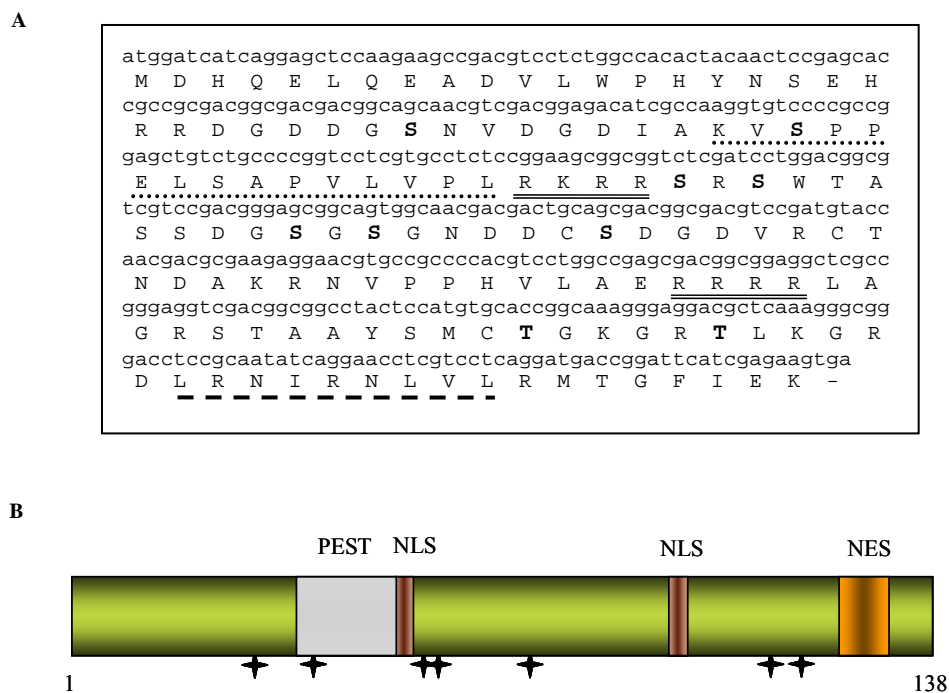


Abb. 6 Aminosäuresequenz des HvS40-Proteins. Die kodierende genomische DNA-Sequenz lässt sich in einen Leserahmen aus 138 Aminosäuren translatieren. **(A)** Die NLS-Sequenzen (doppelt unterstrichen), die hypothetische NES (gestrichelt), sowie die möglichen Phosphorylierungsstellen (fettgedruckt) sind hervorgehoben dargestellt. Die hypothetische PEST-Sequenz ist gepunktet unterteilt. **(B)** Schematischer Aufbau des HvS40-Proteins. Die Position der hypothetischen Phosphorylierungsstellen ist durch schwarze Sterne angegeben.

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation des HvS40-Proteins

Der Nachweis der subzellulären Lokalisation mit Hilfe einer GUS-Fusion vermittelt den Eindruck, dass das HvS40-Protein nicht nur im Kern, sondern auch im Cytoplasma vorliegt (Krupinska *et al.* 2002). Dies würde für eine mögliche ‚Shuttle‘-Funktion des Proteins sprechen. Um die Funktionalität dieses Regulationsmechanismus über eine weitere Analyse nachzuweisen, wurde das HvS40-Gen mit *gfp* fusioniert und unter die Kontrolle des 35S CaMV-Promotors gestellt. Die subzelluläre Lokalisation wurde durch die biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen überprüft. Die Analyse ergab, dass das Fusionsprotein HvS40-GFP ausschließlich im Kern lokalisiert ist (Abb. 7). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte hier keine Lokalisation des HvS40-GFP-Proteins im Cytoplasma beobachtet werden und damit zunächst kein experimenteller Hinweis auf einen Export des Proteins aus dem Zellkern erbracht werden.

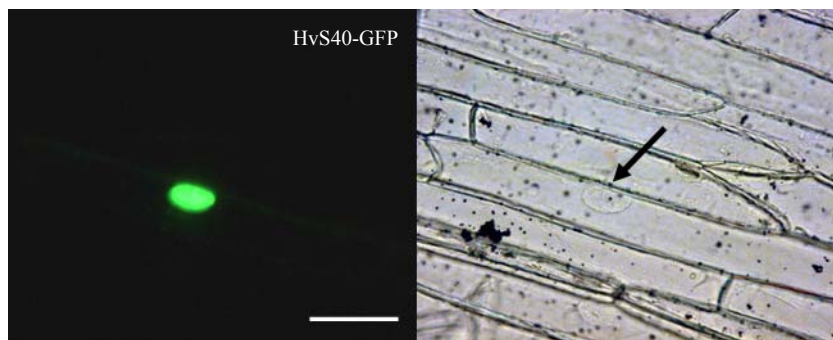


Abb. 7 Analyse der Lokalisation des HvS40-GFP-Fusionsproteins durch biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen. Abgebildet sind das Fluoreszenzbild des GFP und die Hellfeldaufnahme. Der fluoreszierende Zellkern ist in der Hellfeldaufnahme mit einem Pfeil markiert. Die Analyse erfolgte 24 h nach der Transformation unter Einsatz des Axiophots (Zeiss). Der angegebene Maßstab entspricht 20 μm .

3.1.3 Phosphorylierung des HvS40-Proteins

Die Funktion von regulatorischen Proteinen ist häufig abhängig von Modifikationen, wie z.B. der Phosphorylierung von Proteinen. Da das HvS40-Protein über eine Reihe von potentiellen Phosphorylierungsstellen verfügt, wurde ein Phosphorylierungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurde in *E. coli* BL21 überexprimiertes und durch NiNTA nativ aufgereinigtes HvS40-Protein verwendet. Das im N-terminalen Bereich mit einem His-Tag versehene Protein wurde mit einer Proteinkinase und radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP inkubiert. Das überexprimierte HvS40-Protein besitzt aufgrund der Klonierung ein Molekulargewicht von 20 kD (Abb. 8 A). In dem Phosphory-

lierungsansatz konnte unter Einsatz von 10 ng und 100 ng HvS40-Protein nachgewiesen werden, dass das Protein phosphorylierbar ist (Abb. 8). Um die Aktivität interner Kinasen trotz Aufreinigung des Proteins auszuschließen, wurden 100 ng überexprimierten Proteins in einem gleichen Ansatz ohne Zusatz der Kinase mit γ - ^{32}P -ATP inkubiert. Die spezifische Phosphorylierung in diesen Ansätzen wurde unter Einsatz von BSA als negative Kontrolle durchgeführt. Beide Kontrollansätze führten nicht zu einer Phosphorylierung und zeigen, dass eine spezifische Phosphorylierung des HvS40-Proteins im durchgeführten Experiment stattgefunden hat.

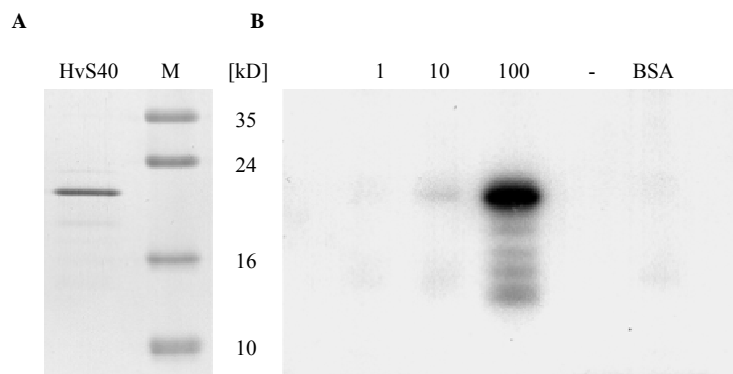


Abb. 8 Phosphorylierung des überexprimierten HvS40-Proteins. **(A)** Aufgereinigtes, in *E. coli* BL21 überexprimiertes HvS40-Protein, das über ein 16 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung angefärbt wurde. **(B)** 1, 10 und 100 ng gereinigtes überexprimiertes Protein wurden mit Hilfe der Proteinkinase A mit radioaktivem γ - ^{32}P -ATP phosphoryliert. Als negative Kontrollen fanden 100 ng überexprimiertes Protein ohne Kinase (-) und 100 ng BSA Verwendung. Abgebildet ist ein Autoradiogramm eines 16 %igen Polyacrylamidgels nach Auftrennung der Proteine und Trocknung des Gels.

3.1.4 Homologien zu Proteinen der DUF584-Familie

Das HvS40-Protein wird in der Datenbank aufgrund seiner Sequenzhomologie einer Gruppe von pflanzenspezifischen Proteinen zugeordnet, deren Funktion unbekannt ist. Diese Gruppe von Proteinen, die als DUF584-Familie bezeichnet wird, besteht aus Proteinen, die alle einen konservierten Abschnitt im C-terminalen Bereich ihrer Sequenz gemeinsam haben (Domain of Unknown Function'). Sequenzen von Proteinen dieser DUF584-Familie liegen aus *A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Medicago truncatula*, *Musa balbisiana*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Vitis vinifera* und *Zea mays* vor. Eine computergestützte Analyse (PROSITE, PRATT) ergab eine Konsensus-Sequenz (**G-X-G-R-X-L-K-G-R-[DE]-[LM]-X(3)-R-[DNT]-X-[IV]-X(4)-G-[FI]**) dieses konservierten Bereichs, die durch eine 80 %ige Übereinstimmung aller untersuchten Sequenzen der DUF584-Proteine zueinander erhalten wurde. Betrachtet man einen Stammbaum, dem ein

‚ClustalW-Alignment‘ (s. 2.14, Thompson *et al.* 1994) zugrunde liegt, kann man innerhalb der Familie fünf Gruppen von Proteinen unterscheiden (Abb. 9).

Auffällig ist, dass bisher jede Pflanze mit Ausnahme von Mais mehrere dieser Proteine besitzt. In Gerste und Weizen sind bisher jeweils nur zwei Sequenzen bekannt. Die Sequenz des HvS40-Proteins der Gerste weist eine 46 %ige Homologie zu einer Sequenz aus Mais (Zm_AW289154) und eine 41%ige Homologie zu einer Sequenz aus Reis (Os_EAY98793) auf. Die höchste Homologie von 92 % besitzt das HvS40-Protein zu einer Sequenz aus Weizen (Ta_BF473337).

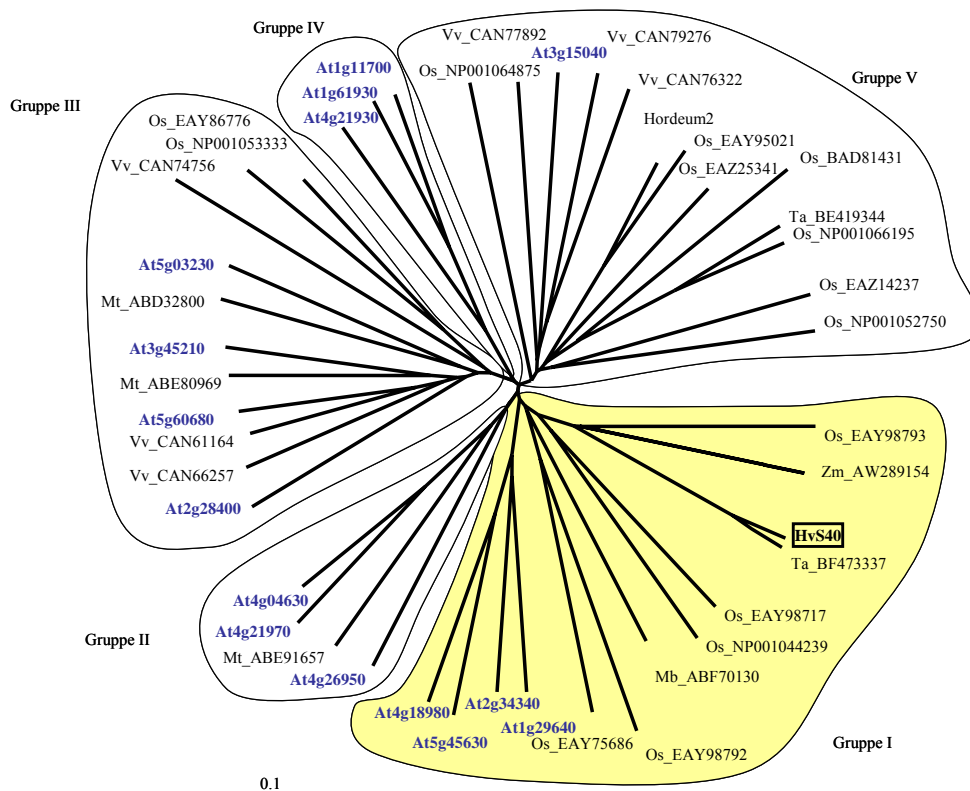


Abb. 9 Phylogenetischer Stammbaum der Proteine der DUF584-Familie. Aufgeführt sind alle bisher bekannten Proteine dieser Familie. Der Stammbaum wurde mit dem Programm ‚ClustalW‘ erstellt (Thompson *et al.* 1994). Es wurde eine Einteilung in fünf Gruppen vorgenommen (Gruppe I ist gelb unterlegt). Das HvS40-Protein (eingerahmt) und die 15 Proteine von *A. thaliana* (blau) wurden hervorgehoben (At *A. thaliana*, Hordeum2 (Krupinska *et al.* 2002), Mb *Musa balbisiana*, Mt *Medicago truncatula*, Os *Oryza sativa*, Ta *Triticum aestivum*, Vv *Vitis vinifera*, Zm *Zea mays*). Im Anhang A1 sind die Proteine dieser Familie tabellarisch aufgeführt.

In *A. thaliana* gibt es fünfzehn Mitglieder in dieser Familie, die sich über alle fünf Gruppen innerhalb der DUF584-Familie verteilen (Abb. 9). Sie kodieren für kleine Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von ca. 12 – 25 kD. Allen gemeinsam ist, dass die zugehörigen Gene wie auch das *HvS40*-Gen keine Intronen besitzen. Die Homologie der Aminosäuresequenzen der 15 *A. thaliana* Proteine untereinander beträgt 80 – 87 %. In der Gruppe I, die das *HvS40*-Protein der Gerste enthält, gibt es vier Proteine aus *A. thaliana* (*At2g34340*, *At1g29640*, *At5g45630*, *At4g18980*), deren Aminosäuresequenzen jedoch nur eine Homologie von maximal 35 % zur *HvS40*-Sequenz aufweisen (Abb. 10). Ein Vergleich der Sequenz des *HvS40*-Proteins mit den Sequenzen der Proteine aus *A. thaliana* der Gruppe I lässt erkennen, dass es trotz eines konservierten Bereiches deutliche Varianzen in den unterschiedlichen Sequenzen der Protein-Familie gibt.

HvS40	MDH QELQ ADVLPWPHY-----NSEHRRDGGDGSNVD-----GDIAKVSPPE-- 41
At2g34340	-MA EEFD SEVVFSDGLSSVLHKENENRL-----FGSDMER--KKTRRIKRTTTEKA 49
At1g29640	-M SEFFD SEIIFSDNYFPIRRREDGNEKENNRPVDFRENSERVWNKSSRRSKTTPLP 59
At5g45630	-M SEFFD SDIIFSDQS-KISTSSRYTKLYNS-----RNDEK--KGTRRHET--AEK- 46
At4g18980	-M SEFFD SEVIFSDDES-FTRKDNKIS--HNN-----ENYER--KSTEDKII----- 41
HvS40	---L--SAPV LVPL RK---R--RSRSWTASSDGSNGNDGSDGDVRCNDAKRNV PPHV 91
At2g34340	--SLSSSLPVSTIPENIFRRYVGKEEYSEEE-----YS--EGGEMIP PHI 92
At1g29640	VTAFSSSLPVNI PMR ---RY--STEEYSDDD-----GGRKMIP PHL 96
At5g45630	-----TSPVRIP TNNFR -----CLEWDT-----TEEEDDK T PPHV 76
At4g18980	-----SSPVRI PSRTTI -----RY-----TEEEGEM T PPHV 67
HvS40	LA ERRRRL AGRSTAA YSMTG KGR TLKGRDL RNI RNLVLRMTG TEK 138
At2g34340	MIGRR IQ ---GGQMAF SVCSG SR TLKGRDL SRVNS VLRLTG TEA 136
At1g29640	IVGR ME ---GGQMAF SVCTG NGR TLKGRDL SRVNS VLKLTG TEA 140
At5g45630	TI ERRMK ---EQIA FSAC --- TLKGRDL SRHNS VLRMTG TEA 114
At4g18980	TI EKRRT ---EAQMA FSEFC --- TLKGRDL SRHNT VLRMTG TEV 106

Abb. 10 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine der DUF584-Familie. Verglichen wurde die Aminosäuresequenz des *HvS40*-Proteins aus Gerste mit den vier Proteinen von *A. thaliana* aus Gruppe I. Identische Aminosäuren aller Sequenzen zueinander sind blau, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt.

Die Untersuchungen zur Funktion des *HvS40*-Proteins in Gerste haben bisher nur geringe Hinweise ergeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, über die Mitglieder der DUF584-Familie in der Modellpflanze *A. thaliana* Hinweise auf die mögliche Funktion des *HvS40*-Proteins zu erhalten. Durch einen Sequenzvergleich wird deutlich, dass es kein offensichtlich zum *HvS40* homologes Protein in *A. thaliana* gibt. Um zu prüfen, ob eines der 15 Gene in *A. thaliana* die gleiche Expression aufweist wie das *HvS40*-Gen der Gerste, wurden zunächst alle 15 Gene der DUF584-Familie im Hinblick auf ihre Expression mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Auf diese Analysen wird in Abschnitt 3.4 näher eingegangen.

3.2 Überexpression des *HvS40*-Gens in Gerste

Zur Aufklärung der Funktion des HvS40-Proteins konnte bisher in einem ersten Versuch zur Veränderung der Expression des *HvS40*-Gens in Gerstenpflanzen durch biolistische Transformation von Antheren nur eine Kosuppressionsmutante erhalten werden (Stöldt 2001). Da sich die Transformation über *Agrobacterium tumefaciens* mittlerweile etabliert hat, wurde erneut versucht, das *HvS40*-Gen in Gerste zu überexprimieren.

Dafür wurde das *HvS40*-Gen zur Überexpression einmal unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors des Aktins (*pAct::HvS40*), zum anderen unter die Kontrolle des samenspezifischen Promotors des D-Hordeins (*pHord::HvS40*) gestellt (Abb. 11). Die samenspezifische Expression des Gens wurde gewählt, da bereits bekannt war, dass die Kosuppressionsmutante eine gestörte Samenentwicklung zeigte und das *HvS40*-Gen auch in Samen exprimiert wird (Stöldt 2001, Wedemeyer 2005). Durch eine gewebespezifische Expression des Gens kann eine Störung in der Entwicklung der Pflanze zunächst vermieden werden und der Effekt der Überexpression in einem spezifischen Gewebe analysiert werden. Als Transformationsvektor diente der binäre Vektor pJH260. Die Transformation erfolgte im Labor von Prof. Dr. Diter von Wettstein (Washington State University, Pullman, USA). Dazu wurden Embryonen der Gerste *Hordeum vulgare* L. cv. 'Golden Promise' mit den transgenen Agrobakterien kokultiviert. Nach mehrfachem Umsetzen der daraus entstandenen Kalli wurden Sprosse regeneriert, die zu Pflanzen heranwuchsen. Die Selektion der Pflanzen erfolgte über das Blattherbizid BASTA. Das zugehörige *bar*-Gen, das für die Phosphinotricin-Acetyltransferase kodiert, steht in den Transformationsvektoren unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors. Zwar wurden resistente Pflanzen erhalten, doch konnte die Insertion des *HvS40*-Gens in das Genom mittels PCR in keiner der regenerierten Pflanzen nachgewiesen werden. Diese Arbeiten wurden im Labor von Prof. Dr. Diter von Wettstein (Washington State University, Pullman, USA) durchgeführt.

Ein erneuter Ansatz zur Überexpression des *HvS40*-Gens wurde in Kooperation mit Dr. Jochen Kumlehn am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt. Dazu wurde ein bereits erfolgreich in Gerste getesteter Transformationsvektor von Dr. Jochen Kumlehn verwendet, der eine konstitutive Überexpression des *HvS40*-Gens unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (*pUbi::HvS40*) und die Selektion über Hygromycin ermöglicht (Abb. 11).

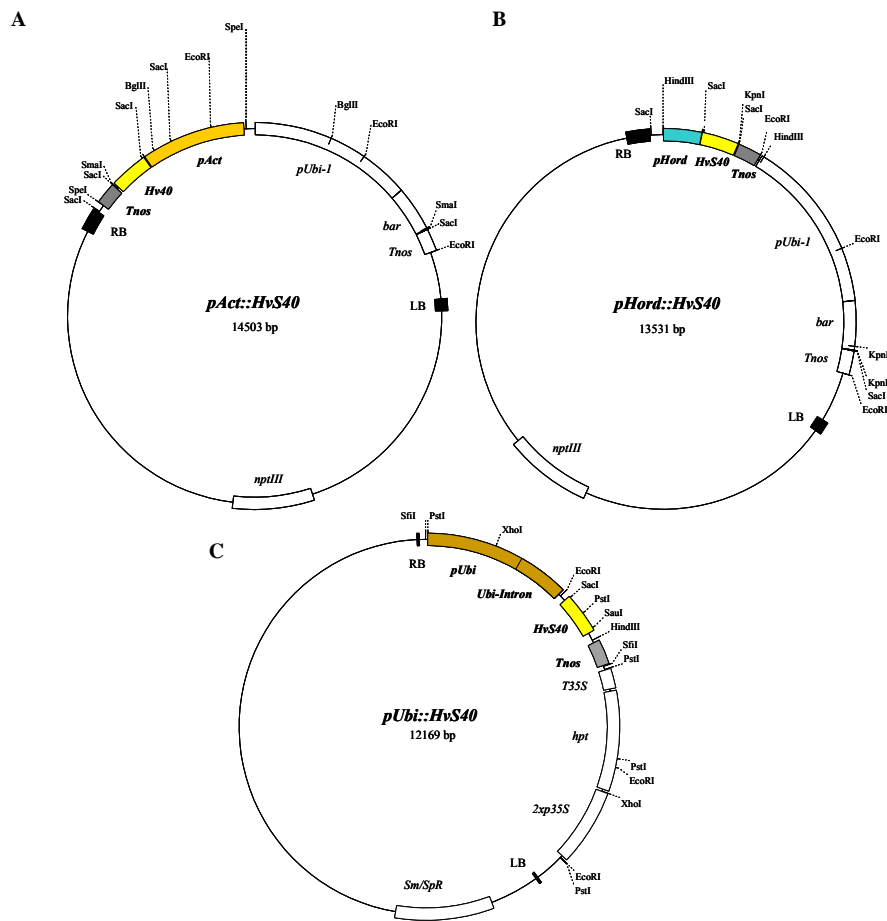


Abb. 11 Schematische Darstellung der für Gerste eingesetzten Transformationskonstrukte. (A) *pAct::HvS40* beinhaltet den Aktinpromotor (*pAct*) aus Reis sowie das *HvS40*-Gen der Gerste. (B) In *pHord::HvS40* ist das *HvS40*-Gen unter die Kontrolle des samenspezifischen Promotors von D-Hordein (*pHord*) gestellt. (C) Das *HvS40*-Gen steht im *pUbi::HvS40* unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (*pUbi*). *bar*= Gen für die Phosphinotricin-Acetyltransferase zur BASTA Selektion, *hpt*= Hygromycin-Resistenzgen, *Tnos*= Terminators der Nopalins-Synthase, *T35S*= Terminators des 35S, *2x35S*= doppelter 35S CaMV-Promotor, *LB*= left border, *RB*= right border, *nptIII*= Kanamycin-Resistenzgen und *Sm/SpR* = Spectinomycin-Resistenzgen.

Die Transformation erfolgte ebenfalls mittels Kokultivierung von Agrobakterien und Embryonen der Gerstensorte 'Golden Promise'. Erst in einem zweiten Transformationsansatz war es möglich, 11 resistente Pflanzen zu erhalten (Abb. 12). Unter diesen Pflanzen konnte in vier *pUbi::HvS40*-Linien (BG116/E04, /E09, /E10, /E11) die Insertion des *HvS40*-Gens in das Genom der Gerste nachgewiesen werden. Dazu wurde aus den Pflanzen genomische DNA isoliert und mittels PCR auf die Insertion des *HvS40*-Gens getestet. Um zu vermeiden, dass das endogene *HvS40*-Gen in der Gerste nachgewiesen wird, wurde ein Fragment amplifiziert, das den Ubiquitin-Promotor in Verbindung mit dem *HvS40*-Gen umfasst. Diese Arbeiten fanden am IPK in Gatersleben statt.

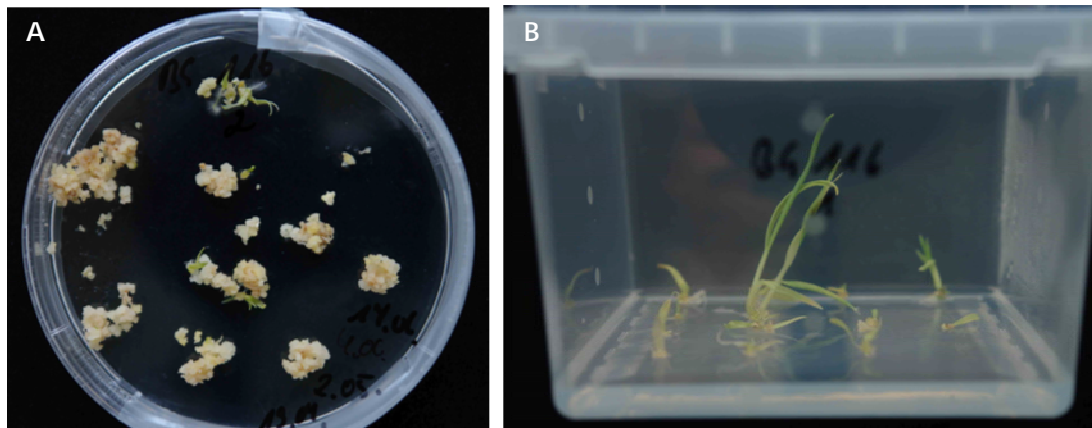


Abb. 12 Dokumentation der Regeneration der Gerstentransformaten *pUbi::HvS40*. **(A)** Kultivierung der Kalli auf Sprossbildungsmedium mit **(B)** anschließender Kultivierung der Sprosse auf Wurzelbildungsmedium.

Um zu prüfen, ob das *HvS40*-Gen konstitutiv exprimiert wird, wurde aus diesen vier Linien zunächst Gesamt-RNA aus Blättern isoliert. Zusätzlich wurde RNA aus der BG116/E01-Linie isoliert, die zwar resistent gegen Hygromycin war, in der das exogen hinzugefügte *HvS40*-Gen im Genom jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurde aus Primärblättern von *Hordeum vulgare* L. cv. ‚Steffi‘, die neun Tage alt waren (9d) und anschließend für drei Tage im Dunkeln inkubiert wurden (9+3dD), Gesamt-RNA isoliert. Während in neun Tage alten Primärblättern keine Expression des *HvS40*-Gens zu erwarten war, ist nach einer Induktion der Seneszenz durch eine dreitägige Dunkelinkubation eine starke Transkriptakkumulation des Gens vorhanden (Kleber-Janke 1996). Zum Nachweis des *HvS40*-Transkriptes konnte nur eine Sonde aus dem kodierenden Bereich des Gens gewählt werden, die es nicht erlaubt, das endogene *HvS40*-Gen von dem exogenen Gen zu unterscheiden.

Die ‚Northern-Blot‘-Analyse ergab, dass in dem verwendeten grünen Blattmaterial der vier Linien, in denen das Transgen im Genom nachgewiesen werden konnte, das *HvS40*-Gen exprimiert wird (Abb. 13). Dagegen war kein Transkript in der BG116/E01-Linie und in 9 Tage alten Primärblättern nachweisbar. Die Inkubation im Dunkeln führte wie zu erwarten zu einer deutlichen Akkumulation des *HvS40*-Transkriptes (Abb. 13). Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sollte zusätzlich gezeigt werden, dass in den transgenen Linien nicht das endogene, sondern das exogene *HvS40*-Transkript in der ‚Northern-Blot‘-Analyse nachgewiesen wurde. Dazu wurde aus der Gesamt-RNA cDNA synthetisiert und für die PCR eingesetzt. Zum einen wurde ein Fragment amplifiziert, das nur den kodierenden Bereich des *HvS40*-Gens umfasste und damit sowohl einen Nachweis des endogenen als auch des exogenen Gens ermöglichte. Zum anderen wurde ein Fragment amplifiziert, das nur das endogene Gen umfasste, da ein reverses Oligonukleotid für die PCR gewählt wurde, das im 3'-Bereich des nicht translatierten Endes

des *HvS40*-Gens bindet. Da dieser 3'-Bereich für die Herstellung des *pUbi::HvS40*-Konstruktes nicht benutzt wurde, war eine Differenzierung zwischen dem endogenen und dem exogenen *HvS40*-Transkripts möglich. Als positive Kontrolle wurde cDNA der 9+3dD-Probe und als negative Kontrolle die cDNA aus der BG116/E01-Linie verwendet. Die RT-PCR-Analyse ergab, dass das endogene *HvS40*-Transkript in keiner der verwendeten *pUbi::HvS40*-Linien, jedoch in 9 Tage alten Primärblättern, die für drei Tage im Dunkeln inkubiert wurden, nachweisbar war (Abb. 22). Der PCR-Nachweis des zusätzlichen *HvS40*-Transkripts bestätigt die Ergebnisse der 'Northern-Blot'-Analyse. Die konstitutive Expression des *HvS40*-Gens scheint in den vier *pUbi::HvS40*-Linien vergleichbar mit der Expression des *HvS40*-Gens während der dunkel-induzierten Seneszenz zu sein (Abb. 13). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine weiteren Analysen der transgenen Pflanzen durchgeführt werden.

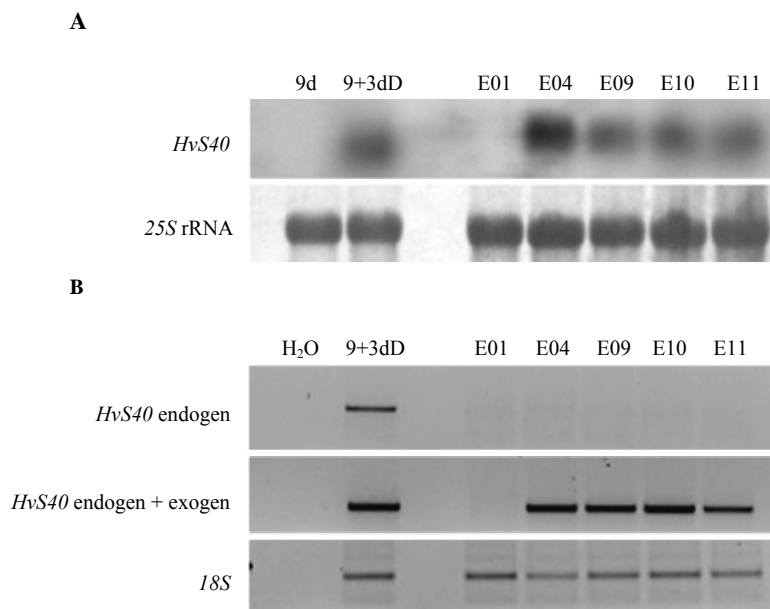


Abb. 13 (A), 'Northern-Blot'-Analyse der Nachkommen der transgenen *pUbi::HvS40*-Linien aus Gerste. 15 µg Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. 9d= RNA aus neun Tage alten Primärblättern von *H. vulgare* L. cv. 'Steffi', die anschließend für drei Tage im Dunkeln inkubiert wurden (9+3dD). Die RNA der transgenen Linien stammte aus grünen Blättern der regenerierten Pflanzen. Abgebildet ist ein Autoradiogramm, das nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, spezifischen *HvS40*-Sonde (NcoI-Fragment aus „1 kb Hind-Klon“) erhalten wurde. Beladungskontrolle = 25S rRNA nach Methylenblaufärbung. **(B)** Nachweis des endogenen und exogenen *HvS40*-Transkriptes mittels semiquantitativer RT-PCR. Oligonukleotide, die für den Nachweis verwendet wurden: endogen (*HvS40for1*, *HvS40rev* 3'UTR), exogen+endogen (*HvS40for1*, *HvS40rev2*). Als Beladungskontrolle wurde das *18S*-Transkript amplifiziert. H₂O = Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

3.3 Überexpression des *HvS40*-Gens in *A. thaliana*

Zur Überexpression des *HvS40*-Gens der Gerste wurde auch die Modellpflanze *A. thaliana* verwendet. Zum einen wurde das *HvS40*-Gen unter Kontrolle des 35S CaMV-Promotors gestellt und zum anderen unter Kontrolle des *SAG13*-Promotors (Abb. 14).

Die konstitutive Überexpression des *HvS40*-Gens in *A. thaliana* ermöglicht eine permanente Beeinflussung der Entwicklung, die schnell zu einem offensichtlichen Phänotyp und damit zu Hinweisen auf die Funktion des kodierenden Proteins führen kann. Da das *HvS40*-Gen in Gerstenpflanzen auch in der Karyopse exprimiert wird, ist bei den transgenen *A. thaliana* Pflanzen, die das Gen unter der Kontrolle des 35S CaMV-Promotors (*p35S*) exprimieren, ein Einfluss auf die Samenentwicklung möglich.

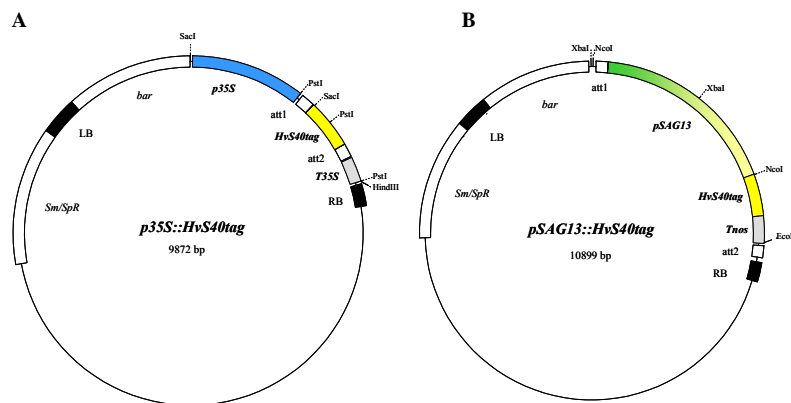


Abb. 14 Schematische Darstellung der Transformationskonstrukte für *A. thaliana*. (A) *p35S::HvS40-HA* beinhaltet den 35S CaMV-Promotor (*p35S*), sowie das *HvS40*-Gen der Gerste in Fusion mit einem HA-Tag (*HvS40-HA*). (B) *pSAG13::HvS40-HA* beinhaltet das in Fusion mit einem HA-Tag stehende *HvS40*-Gen unter Kontrolle des seneszenzspezifischen *SAG13*-Promotors aus *A. thaliana* (*pSAG13*). att1/att2= Rekombinationsseiten des Gateway-Systems, *bar*= Gen für die Phosphotricin-Acetyltransferase zur BASTA-Selektion unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors, *Tnos*= Terminator der Nopal-Synthase, *T35S*= Terminator des 35S CaMV-Promotors, LB= left border, RB= right border, *Sm/SpR* = Spectinomycin-Resistenzgen.

Für die seneszenzspezifische Expression des *HvS40*-Gens wurde der Promotor des *SAG13*-Gens (*pSAG13*) aus *A. thaliana* ausgewählt. Das Gen zeigt eine erhöhte Expression in einer frühen Phase der Seneszenz (Meyer *et al.* 2003). Es ist zu erwarten, dass die Expression des *HvS40*-Gens der Gerste in diesen Pflanzen erst mit Beginn der Blattseneszenz einsetzt. Daher sind hier keine möglichen Störungen der Blattentwicklung durch verfrühte Expression des Gens zu erwarten. Die kodierende Sequenz des *HvS40*-Gens wurde in den Transformationskonstrukten unter Beachtung des Leserahmens im 3'-Bereich mit einem *HA-Tag* (Humaner Influenza Virus-Hemagglutinin, Niman *et al.* 1983) versehen. Damit sollte es möglich sein, das *HvS40*-Protein mit

Hilfe eines bereits etablierten, kommerziell erhältlichen Antikörpers, der gegen den HA-Tag gerichtet ist, nachzuweisen.

Als Selektionsmarker ist in den binären Vektoren das *bar*-Gen, das für die Phosphinotricin-Acetyltransferase kodiert, vorhanden. Dies erlaubt eine Selektion der Pflanzen mit dem Blattherbizid BASTA. Dazu wurden die Samen der transformierten Pflanzen ausgesät und nach vier Wochen Wachstum mit BASTA selektiert (Abb. 15). Für das *p35S::HvS40-HA*-Konstrukt wurden vier und für das *pSAG13::HvS40-HA*-Konstrukt sieben Pflanzen erhalten, die eine Resistenz gegenüber BASTA aufweisen.

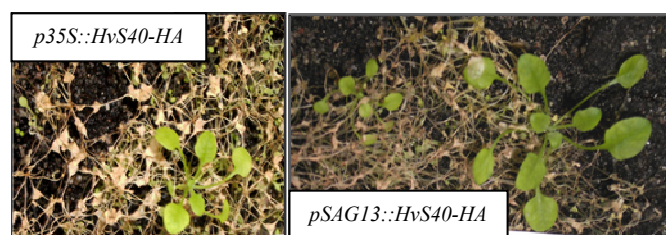


Abb. 15 Selektion von *p35S::HvS40-HA* und *pSAG13::HvS40-HA* transformierten Pflanzen durch Behandlung mit dem Blattherbizid BASTA. Die Samen der transformierten Pflanzen von *A. thaliana* wurden ausgesät und nach 4 Wochen alle 2 Tage mit einer 0,1 %igen BASTA-Lösung besprüht. Abgebildet sind einzelne Pflanzen, die resistent gegen BASTA waren (grün) oder durch die Behandlung eingegangen sind (braun).

3.3.1 Nachweis des *HvS40*-Transkriptes in den Überexpressionslinien von *A. thaliana*

Aus der Transformation von *A. thaliana* Col-0 wurden vier *p35S::HvS40-HA*-Linien und sieben *pSAG13::HvS40-HA*-Linien erhalten, die zunächst auf die Expression des *HvS40*-Gens untersucht wurden. Dazu wurde aus je zwei Nachkommen jeder Linie Gesamt-RNA isoliert.

Für die Analyse der *p35S::HvS40-HA*-Linien wurde RNA aus jungem Pflanzenmaterial verwendet. Aus der ‚Northern-Blot‘-Analyse geht hervor, dass das *HvS40*-Transkript in jungen Pflanzen der *p35S::HvS40-HA*-Linien nachweisbar ist. Die *p35S::HvS40-HA/2*-Linie zeigte dabei die stärkste Transkriptakkumulation, während in der *p35S::HvS40-HA/3*-Linie zwei Transkripte vorhanden waren (Abb. 16). Im Wildtyp wurde erwartungsgemäß kein *HvS40-HA*-Transkript nachgewiesen.

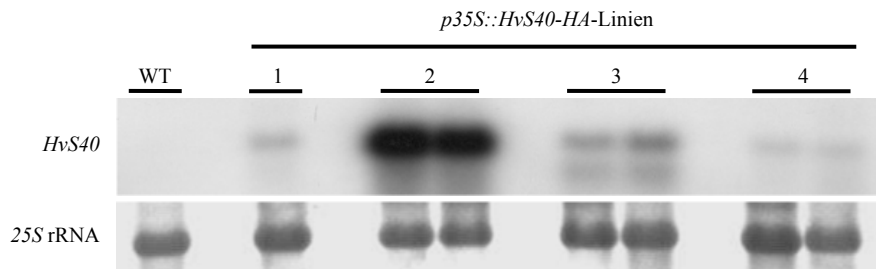


Abb. 16 ‚Northern-Blot‘-Analyse der Nachkommen der vier transgenen *p35S::HvS40-HA*-Linien aus *A. thaliana*. Analysiert wurde RNA von je zwei jungen Pflanzen jeder Linie und vom Wildtyp (WT). Aus der *p35S::HvS40-HA*-Linie 1 ist nur ein Nachkomme hervorgegangen. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Abgebildet ist ein Autoradiogramm, das nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, spezifischen *HvS40-HA*-Sonde (*NcoI/KpnI*-Fragment aus „HC345/S40-HA-Klon“) erhalten wurde. Beladungskontrolle = 25S rRNA nach Methylenblaufärbung.

Die Expression des *HvS40*-Gens in den sieben *pSAG13::HvS40-HA*-Linien erfolgte unter Kontrolle des seneszenzspezifischen *SAG13*-Promotors. Deshalb ist eine Expression des Gens erst in seneszenten Stadien zu erwarten. Für den Nachweis des *HvS40*-Transkripts in den sieben *pSAG13::HvS40-HA*-Linien wurde Gesamt-RNA aus bereits seneszierendem Blattmaterial verwendet (Stadium S1, 30 - 50 % Chlorophyllverlust). In der ‚Northern-Blot‘-Analyse konnte nur in den Nachkommen der *pSAG13::HvS40-HA/6*-Linie das *HvS40*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 17). Da es sich bei dem verwendeten Blattmaterial um bereits seneszenten Material handelte, war davon auszugehen, dass der *SAG13*-Promotor bereits aktiv war. Die Aktivität des Promotors wurde in den einzelnen Proben zudem durch den Nachweis des endogenen *SAG13*-Transkripts aus *A. thaliana* überprüft (Abb. 17). Da der Nachweis mit Hilfe der ‚Northern-Blot‘-Analyse bei 10 µg Gesamt-RNA zu keinem Ergebnis führte, wurde als Methode die semi-quantitative RT-PCR gewählt. Es konnte in allen Stadien das *SAG13*-Transkript nachgewiesen werden, wobei in der *pSAG13::HvS40-HA/6*-Linie eine höhere Transkriptmenge vorhanden war. Dies korreliert mit der Menge des nachgewiesenen *HvS40*-Transkripts in dieser Linie. Trotz der Aktivität des *SAG13*-Promotors in allen Linien war das *HvS40*-Transkript aber nur in der *pSAG13::HvS40-HA/6*-Linie nachweisbar.

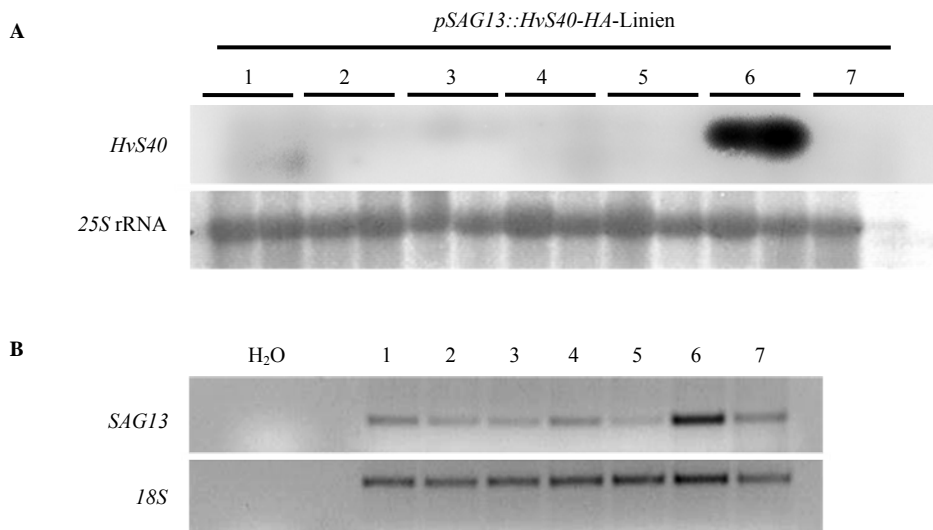


Abb. 17 (A) „Northern-Blot“-Analyse der Nachkommen der transgenen *pSAG13::HvS40-HA*-Linie aus *A. thaliana*. 10 µg Gesamt-RNA aus Blättern des Stadiums S1 von je zwei Pflanzen wurden verwendet. Abgebildet ist ein Autoradiogramm nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, spezifischen *HvS40-HA*-Sonde. Beladungskontrolle = 25S rRNA nach Methylenblaufärbung. **(B)** Nachweis des *SAG13*-Transkriptes. Eine Pflanze jeder *pSAG13::HvS40-HA*-Linie wurde mittels semiquantitativer RT-PCR auf die Expression des *SAG13*-Gens untersucht. Als konstitutive Kontrolle diente der Nachweis des *18S*-Transkripts. H₂O = Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

Aus der Transformation von *A. thaliana* konnten vier *p35S::HvS40-HA*-Linien erhalten werden, die das *HvS40*-Gen konstitutiv exprimieren. Dabei wurde in der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie die stärkste Transkriptakkumulation nachgewiesen. Aus der Transformation des *pSAG13::HvS40-HA*-Konstruktes gingen sieben unabhängige Linien hervor. Es konnte jedoch nur in der *pSAG13::HvS40-HA/6*-Linie das *HvS40*-Transkript seneszenzspezifisch nachgewiesen werden.

3.3.2 Immunologischer Nachweis des HvS40-Proteins in der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie

Die transgenen Linien, die das *HvS40*-Gen konstitutiv exprimieren, sollen hier zunächst zum Nachweis des Proteins verwendet werden, denn in diesen Linien ist ein erhöhter Gehalt an *HvS40*-Protein zu erwarten. Da in der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie im Vergleich zu den übrigen Linien die höchste Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte (Abb. 16), wurden diese Pflanzen für den immunologischen Nachweis des *HvS40*-Proteins verwendet. Es wurden Gesamtprotein-extrakte und Kernproteine aus der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie im Vergleich entsprechender Proteine des Wildtyps analysiert. Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, besteht die Hypothese, dass das *HvS40*-Protein (15,4 kD) instabil ist und schnell degradiert wird. Deshalb wurden bei der Aufarbeitung der Gesamt- und Zellkernproteine aus Blattmaterial Protease- und Proteasom-

Inhibitoren verwendet. Als Antikörper dienten ein gegen das überexprimierte HvS40-Protein synthetisierter Antikörper aus Kaninchen und ein gegen den HA-Tag gerichteter Antikörper aus Ratte (Dianova, Hamburg).

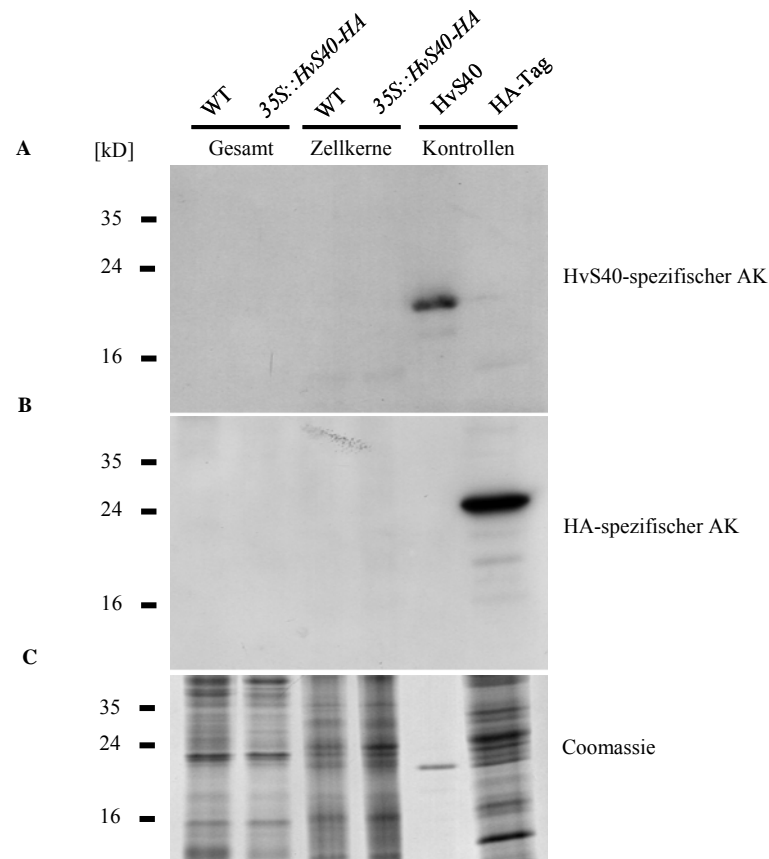


Abb. 18 Immunologischer Nachweis des HvS40-Proteins in der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie. Je 20 µg Gesamtprotein und Kernproteine vom Wildtyp und der transgenen Linie wurden in einem 16 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurden 100 ng überexprimiertes HvS40-Protein und 10 µg Gesamtproteineextrakt einer transgenen *AtWhy1*-HA-Überexpressionslinie (HA-Tag, Grabe 2007) als Kontrollen verwendet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem **(A)** HvS40-spezifischen und **(B)** HA-spezifischen Antikörper. Abgebildet sind Autoradiogramme nach ECL-Detektion und **(C)** ein mit Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel.

In Gesamtproteinextrakten, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, war es weder mit Hilfe des HvS40-spezifischen Antikörpers noch mit Hilfe des HA-spezifischen Antikörpers möglich, ein Protein von 15,4 kD nachzuweisen (Abb. 18). Aus transienten Ansätzen war bekannt, dass das Protein im Zellkern lokalisiert ist (s. 3.1.2). Um das Protein anzukonzentrieren und damit nachweisbar zu machen, wurden Zellkerne aus Blättern der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie isoliert. 20 µg Zellkernproteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu zeigen, wurden positive Kontrollen verwendet. Der HvS40-spezifische

Antikörper wurde mit Hilfe von Überexprimiertem HvS40-Protein, das nach Klonierung ein Molekulargewicht von 20 kD besitzt, überprüft. Als Kontrolle für den HA-spezifischen Antikörper wurde ein Gesamtproteinextrakt aus transgenen *A. thaliana*-Linien verwendet, die das AtWhy1-Protein (24 kD) mit einem HA-Tag überexprimieren (Grabe 2007). In der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie, in der das *HvS40*-Transkript verstärkt akkumuliert, war im Vergleich zum Wildtyp ein erhöhter Gehalt an HvS40-Protein zu erwarten. Während die Antikörper spezifisch mit den Kontrollproben reagierten, war es mit Hilfe beider Antikörper in den Zellkernfraktionen der transgenen Linie nicht möglich, spezifisch ein Protein von 15,4 kD nachzuweisen (Abb. 18).

3.4 Untersuchungen zur Expression der DUF584-Gene aus *A. thaliana*

In diesem Abschnitt sollen die Mitglieder der DUF584-Familie in der Modellpflanze *A. thaliana* näher analysiert werden. In Abschnitt 3.1.4 konnte durch einen Sequenzvergleich kein offensichtlich zum HvS40-Protein homologes Protein in *A. thaliana* ermittelt werden. Um ein Gen in *A. thaliana* zu identifizieren, das die gleiche Expression wie das *HvS40*-Gen der Gerste aufweist, wurden zunächst alle 15 Gene der DUF584-Familie aus *A. thaliana* im Hinblick auf ihre Expression untersucht. Die Expression der Gene wurde während der Seneszenz, unter Einfluss von Phytohormonen und nach Infektion mit Pathogenen mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert.

3.4.1 Altersbedingte Seneszenz

Das Transkript des *HvS40*-Gens akkumuliert in Gerste, sowohl bei der natürlichen Seneszenz von Primärblättern und Fahnenblättern als auch bei der dunkelinduzierten Seneszenz von Primärblättern. Um in *A. thaliana* ein homologes Gen zum *HvS40* der Gerste aus der DUF584-Familie zu ermitteln, wurde zunächst die Expression der Gene von *A. thaliana* im Hinblick auf eine Akkumulation der Transkripte während der natürlichen Seneszenz der Rosettenblätter untersucht. Dabei wurden 4 verschiedene Stadien von Rosettenblättern aus einer Population von Pflanzen geerntet (Otegui *et al.* 2005). Die Stadien wurden anhand des relativen Chlorophyllverlusts als nicht seneszent (NS), früh seneszent (S1), mittel seneszent (S2) und spät seneszent (S3) eingestuft. Zur molekularen Charakterisierung dieser Stadien wurden zunächst die Transkriptgehalte der Gene *lhcA1*, *SAG12* (Gan und Amasino 1997) und *AtSEN1* (Oh *et al.* 1996) untersucht. Die Abnahme des Transkriptes des *lhcA1*-Gens, das für ein Chlorophyll *a/b*-Bindeprotein kodiert, geht einher mit der Abnahme des Chlorophyllgehalts. Das Transkript des Seneszenzmarker-Gens *SAG12* nimmt wie zu erwarten im Verlauf der Seneszenz zu (Abb. 19). Das *AtSEN1*-Transkript akkumuliert ebenfalls während der Seneszenz, ist aber schon in ausgewachsenen

grünen Blättern nachweisbar. Unter Einsatz genomischer DNA konnte mit Hilfe von Intronen übergreifenden Oligonukleotiden für die Gene *lhcA1*, *AtSEN1* und *SAG12* gezeigt werden, dass die synthetisierte cDNA frei von genomischer DNA war (Abb. 19). Als interner Standard zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde das *18S*-Transkript amplifiziert.

Die entwicklungsabhängige Akkumulation der Transkripte der Kontrollgene *AtSen1* und *SAG12* zeigen, dass das geerntete Blattmaterial von *A. thaliana* zur Untersuchung der seneszenzabhängigen Expression der DUF584-Gene verwendet werden kann. Die entsprechende Untersuchung zur Expression der DUF584-Gene aus *A. thaliana* ergab, dass einige Gene während der natürlichen Seneszenz verstärkt exprimiert werden (Abb. 19). Für die meisten Gene konnten schon im nicht seneszenten Stadium (NS) Transkripte nachgewiesen werden. Von diesen Genen akkumulieren deutlich die Transkripte der Gene *At2g28400*, *At1g11700* und *At1g61930* stetig im Laufe der Seneszenz und die Transkripte der Gene *At5g45630* und *At3g15040* erst in der späten Phase der Seneszenz (S3). Die Gene *At1g29640* und *At4g18980* der Gruppe I zeigen eine seneszenzspezifische Expression. Ein gegenläufiges Verhalten mit abnehmender Transkriptmenge während der Seneszenz zeigen die Gene *At4g04630*, *At4g21970*, *At3g45210* und *At4g21930*. Die Transkriptakkumulation der untersuchten Gene während der natürlichen Seneszenz kann durch *in silico*-Analysen für die Gene *At5g45630*, *At4g18980*, *At2g28400*, *At1g11700* und *At3g15040* bestätigt werden. Diese Mikroarray-Daten stehen nicht für das Gen *At1g29640* zur Verfügung.

Die RT-PCR-Analysen zur Genexpression während der natürlichen Seneszenz von *A. thaliana* zeigen, dass innerhalb einer Gruppe der DUF584-Familie die Expressionsmuster der einzelnen Gene nicht gleich sind. Allerdings ist auffällig, dass unter den Genen von *A. thaliana* jeweils ein Genpaar mit der engsten Verwandtschaft auf Proteinebene ein ähnliches Expressionsmuster zeigt, wie es z.B. für das Genpaar *At1g11700* und *At1g61930* in der Gruppe IV besonders deutlich ist. Unter den Mitgliedern der Gruppe I sind solche zu finden, die eine stark seneszenzassoziierte Akkumulation der zugehörigen Transkripte aufweisen.

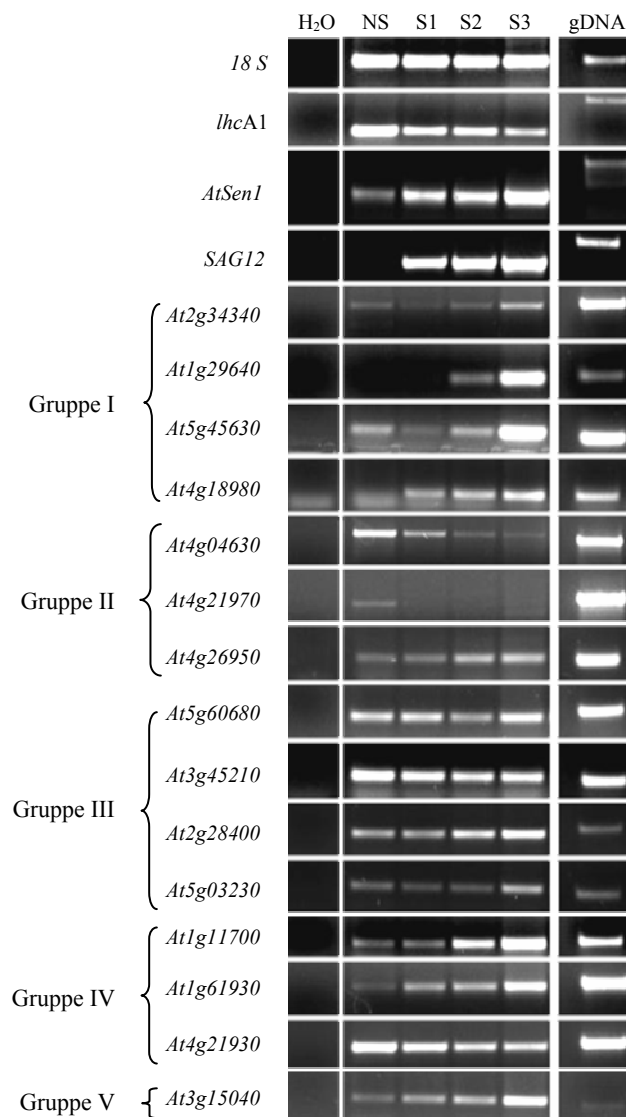


Abb. 19 Transkriptgehalte der Gene der DUF584-Familie im Verlauf der natürlichen Seneszenz von *A. thaliana*. Einstufung der Rosettenblätter in Seneszenzstadien: NS = nicht seneszent, S1 = 30 - 50 %, S2 = 50 - 75 %, S3 >75 % Chlorophyllverlust (Otegui *et al.* 2005). Aus je 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relative Transkriptmenge durch RT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle für die Beladung diente das *18S*-Transkript. Die untersuchten Gene sind den Gruppen I - V zugeordnet. *lhca1* = Gen für ein Chlorophyll a/b-Bindeprotein, *AtSen1* und *SAG12* = seneszenzassoziierte Gene, gDNA = Überprüfung der Oligonukleotide unter Einsatz genomischer DNA, H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

3.4.2 Stressabhängige Expression

Im vorigen Abschnitt wurden sieben Gene von *A. thaliana* der DUF584-Familie identifiziert, deren Transkriptmengen während der natürlichen Seneszenz deutlich akkumulierten. Die Expression der sieben Gene soll während unterschiedlicher Stressbedingungen untersucht werden. Zunächst wurde die Expression während der dunkelinduzierten Seneszenz geprüft. Des Weiteren wird der Einfluss der Phytohormone Abscisinsäure, Jasmonat und Salicylsäure getestet. Die Wirkung von biotischem Stress auf die Expression der Gene wurde anhand eines bakteriellen und eines pilzlichen Erregers analysiert.

3.4.2.1 Dunkelinduzierte Seneszenz

Um zu prüfen, ob unter den sieben während der natürlichen Seneszenz exprimierten Genen aus *A. thaliana* auch solche sind, die wie das *HvS40*-Gen der Gerste während der dunkelinduzierten Seneszenz exprimiert werden, wurde RNA aus der gesamten Rosette von *A. thaliana* nach 1, 2, 3 und 4 Tagen Dunkelinkubation isoliert und untersucht. Als Kontrollen wurden Pflanzen weiter im Licht-/Dunkelrhythmus angezogen und zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Da sich durch längere Inkubationszeiten die Expression der Gene nicht mehr veränderte, sind in Abbildung 20 nur die Ergebnisse nach zweitägiger Dunkelinkubation aufgeführt.

Um auf molekularer Ebene zu bestätigen, dass die Dunkelinkubation eine seneszenzassoziierte Genexpression zur Folge hat, wurde das *AtSen1*-Transkript nachgewiesen, das sowohl bei der natürlichen als auch bei der dunkelinduzierten Seneszenz verstärkt exprimiert wird (Oh *et al.* 1996). Das *AtSen1*-Transkript ist bereits in den Kontrollpflanzen nachweisbar und akkumuliert nach einem Tag Dunkelinkubation (Abb. 20). Die drei Gene der Gruppe I (*At1g29640*, *At5g45630*, *At4g18980*), sowie das Gen *At2g28400* der Gruppe III zeigen unter diesen Bedingungen eine deutliche Transkriptakkumulation. Die Transkriptmengen der Gene *At3g15040* und *At1g61930* bleiben hingegen während der Dunkelinkubation unverändert. Das Transkript des Gens *At1g11700* weist ebenfalls eine leichte Akkumulation auf, die aber in einem wiederholten Versuchsansatz mit abgeschnittenen Blättern nicht bestätigt werden konnte (Abb. 20 B). Die vier Gene *At1g29640*, *At5g45630*, *At4g18980* und *At2g28400* werden aufgrund ihrer seneszenzabhängigen Transkriptakkumulation als *AtS40-1*, *AtS40-2*, *AtS40-3* und *AtS40-4* definiert, da sie wie das *HvS40*-Gen unter beiden Seneszenzbedingungen eine Rolle zu spielen scheinen. In den folgenden Untersuchungen wurde der Schwerpunkt auf die Expression dieser vier Gene gelegt.

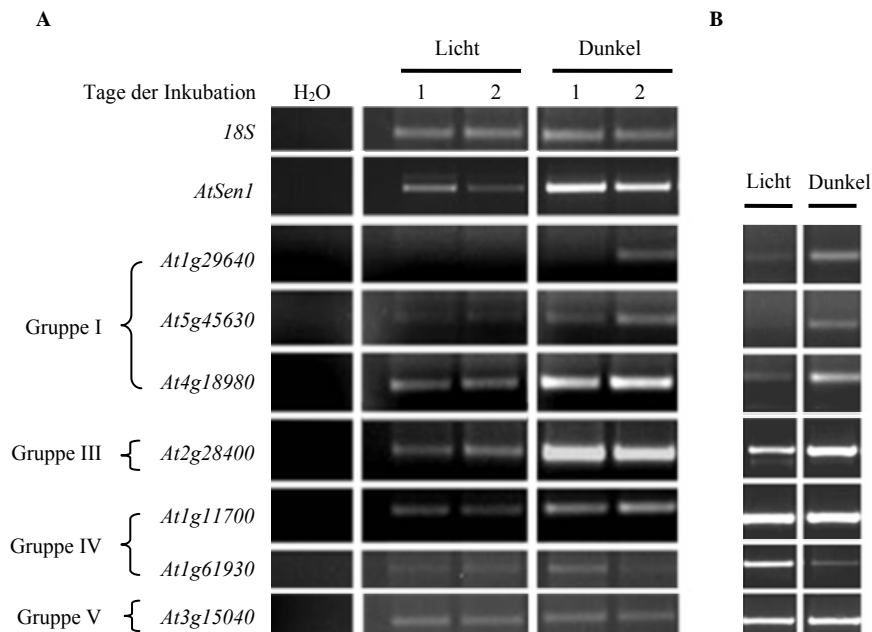


Abb. 20 Transkriptgehalte verschiedener Mitglieder der DUF584-Familie nach dunkelinduzierter Seneszenz in Rosettenblättern von *A. thaliana*. **A** 4 - 6 Wochen alte Pflanzen wurden für 1 und 2 Tage im Dunkeln inkubiert. **B** Versuchsansatz mit abgeschnittenen Blättern, die für 2 Tage schwimmend auf Leitungswasser im Dunkeln inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden die Pflanzen oder Blätter weiter im Licht-/Dunkelrhythmus kultiviert. Aus je 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relative Transkriptmenge durch RT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle für die Beladung wurde das 18S-Transkript abgebildet. *AtSen1* = seneszenz-assoziiertes Gen, H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

3.4.2.2 Inkubation mit Phytohormonen

Es ist bekannt, dass die Expression des *HvS40*-Gens der Gerste auch in nichtseneszenten Blättern durch Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure (MeJa) und Salicylsäure (SA) ausgelöst wird (Krupinska *et al.* 2002). Um den Effekt dieser Hormone auf die Expression der vier Gene der DUF584-Familie in *A. thaliana* zu prüfen, wurden 4 - 6 Wochen alte Pflanzen jeweils mit den Hormonen Abscisinsäure, Methyljasmonat und Salicylsäure besprüht und für 1, 2, 3 und 4 Tage inkubiert. Der Effekt der exogen applizierten Hormone wurde anhand der Expression entsprechender Kontrollgene überprüft. Das *hpd*-Gen kodiert für die 4-Hydroxyphenyl-Pyruvat-Dioxygenase, einem Enzym der Vitamin E-Biosynthese, und weist eine ABA-induzierbare und seneszenzassoziierte Expression auf (Falk *et al.* 2002, Dähnhardt 2003). Das Transkript des Defensin-Gens *PDF1.2* akkumuliert bei Behandlung mit MeJa und bei Pathogenbefall (Glazebrook 2005). Das *PR1*-Gen ist ein 'pathogenesis related gene', das bei SA angeschaltet wird (Oh *et al.* 1996). Die Kontrollgene zeigen nach Hormonbehandlung die erwartete Akkumulation ihrer Transkripte (Abb. 21).

Bei den Genen *AtS40-2*, *AtS40-3* und *AtS40-4* konnte schon nach einem Tag Inkubation mit ABA ein Anstieg in der Expression erzielt werden, der sich durch längere Inkubationszeiten nicht mehr veränderte (Abb. 21). Das Gen *AtS40-1* zeigt auch nach längerer Inkubationszeit keine veränderte Expression. Aus diesem Grund sind in den Abbildungen nur die ersten zwei Inkubationstage aufgeführt. Im Unterschied zur Abscisinsäure hat eine viertägige Behandlung mit Methyljasmonat bei ausdifferenzierten Blättern keinen stimulierenden Effekt auf die Expression der untersuchten Gene der DUF584-Familie.

Die Inkubation mit 4 mM Salicylsäure zeigte, dass die Gene *AtS40-2* und *AtS40-3* eine deutliche und *AtS40-4* eine geringe Akkumulation der Transkripte aufweisen, während für das Gen *AtS40-1* keine Veränderung in der Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 21).

An ausdifferenzierten Rosettenblättern konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene *AtS40-2*, *AtS40-3* und *AtS40-4*, nicht aber die des Gens *AtS40-1*, durch ABA und SA gefördert wird. Keines der Gene ließ sich durch die Behandlung der Blätter mit Methyljasmonat beeinflussen.

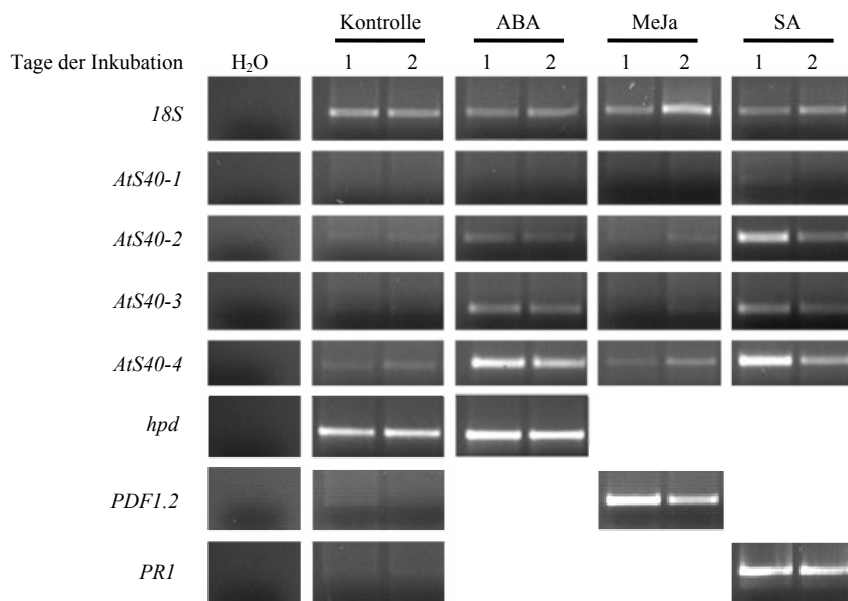


Abb. 21 Einfluss von Phytohormonbehandlungen auf die Genexpression einzelner Mitglieder der DUF584-Familie von *A. thaliana*. Fünf Wochen alte Pflanzen wurden jeweils mit 100 μ M Hormonlösungen von ABA und MeJa und einer 4 mM SA-Lösung besprüht und für 1 und 2 Tage inkubiert. Als Kontrolle diente Leitungswasser. Aus je 2 μ g Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relative Transkriptmenge durch RT-PCR quantifiziert. Für die Beladung wurde das *18S*-Transkript verwendet. Um den Effekt der Inkubation zu überprüfen, wurden die Transkripte der folgenden Gene nachgewiesen: ABA = *hpd*, MeJa = *PDF1.2*, SA = *PR1*, H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

3.4.2.3 Pathogeninfektion

Die Expression des *HvS40*-Gens ist nicht nur während der Seneszenz und unter Einfluss von Phytohormonen erhöht, sondern auch bei Infektion mit dem Pathogen *Pyrenophora teres* (Krupinska *et al.* 2002). Über *in silico*-Daten sind Hinweise vorhanden, dass die Expression der vier untersuchten *AtS40*-Gene der DUF584-Familie ebenfalls durch Pathogenbefall beeinflussbar ist. Dazu wurden in Kooperation mit Prof. Thomas Roitsch an der Universität Würzburg Pflanzen von *A. thaliana* für 1 und 2 Tage zum einen mit dem virulenten Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und zum anderen mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* kokultiviert. Als Kontrollen dienten nicht infizierte Pflanzen, die nur mit dem Erregermedium behandelt wurden.

Um eine Veränderung in der Genexpression durch die Infektionen nachzuweisen, wurde zunächst die zu erwartende Transkriptakkumulation des *PR1*-Gens unter Einfluss von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Uknes *et al.* 1992) und die des *PDF1.2*-Gens unter Einfluss von *Botrytis cinerea* (Govrin und Levine 2002), untersucht. Das *PR1*-Gen zeigt nach zwei Tagen Infektion mit dem bakteriellen Erreger eine erhöhte Transkriptmenge. Das *PDF1.2*-Gen ist durch die Behandlung mit dem pilzlichen Erreger *Botrytis cinerea* bereits nach einem Tag verstärkt exprimiert (Abb. 22).

Die Inkubation mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 führte bei allen vier untersuchten *AtS40*-Genen bereits nach einem Tag zu einer erhöhten Expression. Die Gene *AtS40-1* und *AtS40-3* zeigen dabei im Vergleich zur Kontrolle eine stark erhöhte Expression, während die Transkripte der Gene *AtS40-2* und *AtS40-4* schon in nicht infiziertem Gewebe gut nachweisbar waren und durch die Infektion eine starke Zunahme in der Transkriptmenge erfahren. Die Infektion mit dem Pilz *Botrytis cinerea* führte bei keinem der vier untersuchten Gene zu einer Stimulation der Expression (Abb. 22).

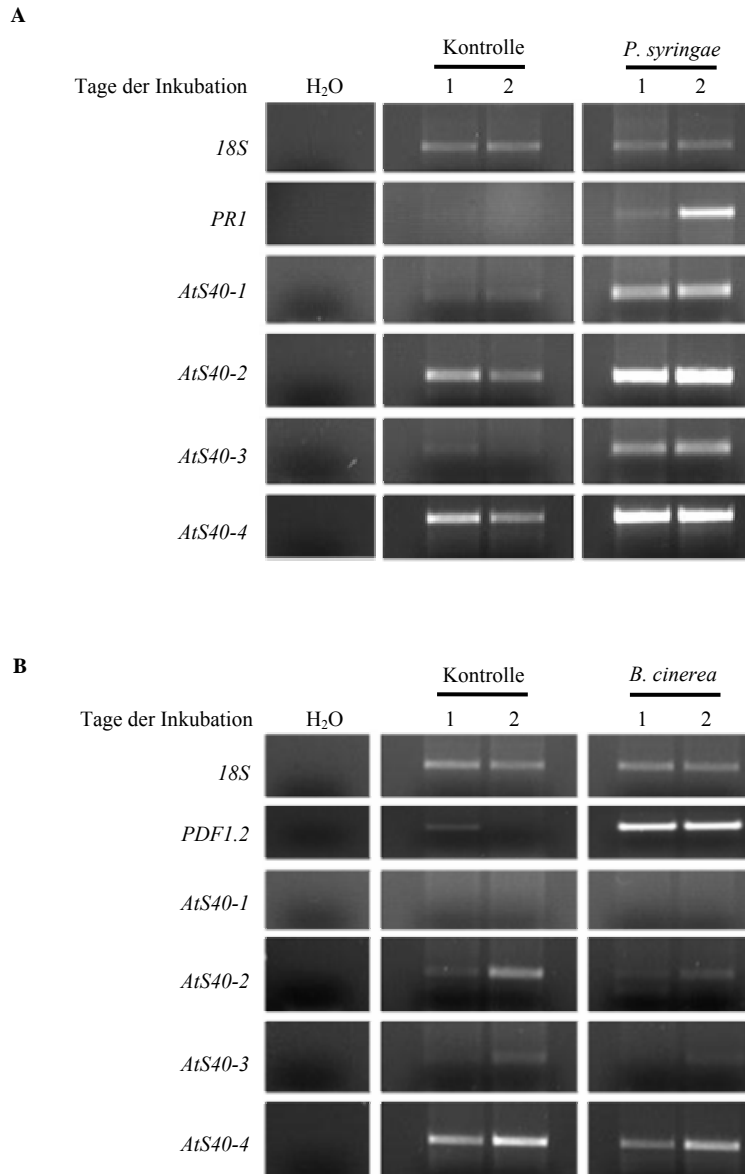


Abb. 22 Einfluss von Pathogenbefall auf die Expression der vier *AtS40*-Gene in *A. thaliana*. Pflanzen wurden mit dem Erreger infiziert und für 1 und 2 Tage kokultiviert. Als Kontrolle diente nicht infiziertes Material, das mit Erregermedium behandelt wurde. Aus je 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relative Transkriptmenge durch RT-PCR quantifiziert. **(A)** Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. **(B)** Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*. Als Kontrollen für die erfolgreiche Infektion wurden das PR1- und das PDF1.2-Transkript amplifiziert. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des 18S-Transkripts. H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

3.4.3 Tabellarische Zusammenfassung der Expression der DUF584-Gene

In diesem Abschnitt sollen kurz die Ergebnisse zur Untersuchung der Expression der DUF584-Gene aus *A. thaliana* in Form einer Tabelle zusammengefasst werden. Es sind nur die vier Gene berücksichtigt, deren Expression während der altersbedingten und dunkelinduzierten Seneszenz erhöht ist. Die Behandlung mit Methyljasmonat und die Infektion mit dem Pilz *Botrytis cinerea* wurden dabei nicht aufgelistet, da unter diesen Bedingungen keine verstärkte Expression der untersuchten Gene festgestellt wurde. Die Ergebnisse zu den Expressionsanalysen aller sieben untersuchten Gene, die eine Transkriptakkumulation während der altersbedingten Seneszenz aufweisen, sind im Anhang A2 aufgeführt.

Die Gene *AtS40-2*, *AtS40-3* (Gruppe I) und *AtS40-4* (Gruppe III) zeigen ein zum *HvS40*-Gen der Gerste vergleichbares Expressionsmuster (Tab. 8). Demgegenüber zeigte das *AtS40-1*-Gen in den hier analysierten Ansätzen keine Veränderung in seiner Expression durch die Behandlung von 4 - 6 Wochen alten Pflanzen mit den Hormonen Abscisinsäure und Salicylsäure. Es wurden also drei Gene (*AtS40-2*, *AtS40-3*, *AtS40-4*) identifiziert, die aufgrund ihrer Expression in *A. thaliana* funktionell die gleiche Rolle spielen könnten wie das *HvS40*-Gen der Gerste. Auf die kodierenden Proteine dieser drei Gene wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Tab. 8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression der vier *AtS40*-Gene von *A. thaliana*. Eine Erhöhung der Transkriptmenge durch die jeweilige Behandlung ist durch einen nach oben weisenden Pfeil gekennzeichnet. Vergleichend ist die Expression des *HvS40*-Gens der Gerste abgebildet.

	Altersbedingte Seneszenz	Dunkelinduzierte Seneszenz	Abscisinsäure	Salicylsäure	biotropher Pathogen
<i>AtS40-1</i>	↑	↑	-	-	↑
<i>AtS40-2</i>	↑	↑	↑	↑	↑
<i>AtS40-3</i>	↑	↑	↑	↑	↑
<i>AtS40-4</i>	↑	↑	↑	↑	↑
<i>HvS40</i>	↑	↑	↑	↑	↑

3.4.4 Subzelluläre Lokalisation der AtS40-Proteine

Das *HvS40*-Gen kodiert für ein 15,4 kD Protein, über dessen Eigenschaften kaum etwas bekannt ist. Das Protein verfügt über zwei Kernlokalisierungssignale (NLS), hypothetische Phosphorylierungsstellen und eine Kernexportsequenz (NES). Durch transiente Transformation von Zwiebel-epidermiszellen konnte mit Hilfe von Fusionsproteinen sowohl mit GFP (s. 3.1.2) als auch mit GUS eine Lokalisation im Zellkern gezeigt werden (Krupinska *et al.* 2002).

Die kodierenden Proteine der drei Gene aus *A. thaliana* haben ein relativ kleines Molekulargewicht, das für AtS40-2 bei 13,4 kD und für AtS40-3 bei 12,5 kD liegt, während das AtS40-4-Protein ein Molekulargewicht von 18 kD besitzt. Die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine ist bisher experimentell nicht untersucht. Unter Verwendung von verschiedensten Datenbanken (PSORT, WoLFPSORT, PROTCOMP Version 6.1, s. 2.14) konnte keine eindeutige Zuordnung zu einem Zellkompartiment ermittelt werden. Ebenso besitzen die Proteine keine NLS- oder NES-Sequenzen. Eine Analyse der Aminosäuresequenzen der AtS40-Proteine hat ergeben, dass alle Proteine über hypothetische Phosphorylierungsstellen verfügen. Des Weiteren besitzen die Proteine AtS40-3 und AtS40-4 hypothetische PEST-Sequenzen, die charakteristisch sind für eine kurze Halbwertszeit von Proteinen (s. 3.1.1).

Zur subzellulären Lokalisierung der Proteine wurden die kodierenden Sequenzen der Gene unter Verwendung von GUS-Fusionskonstrukten unter die Kontrolle des 35S CaMV-Promotors gebracht und für die biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen eingesetzt. Als Kontrolle wurde das GUS-Protein allein verwendet, das ein Molekulargewicht von 68 kD besitzt und in den Zwiebelepidermiszellen eine cytoplasmatische Lokalisation aufweist (Abb. 23). Als Referenz für eine Lokalisation im Zellkern wurde das *HvS40*-GUS-Fusionskonstrukt verwendet (Krupinska *et al.* 2002). Für das Fusionsprotein AtS40-3-GUS waren wie für das *HvS40*-GUS-Fusionsprotein eine Lokalisation im Cytoplasma und eine geringe Anreicherung im Zellkern nachweisbar, während die Fusionsproteine AtS40-2-GUS und AtS40-4-GUS nur im Cytoplasma akkumulierten (Abb. 23).

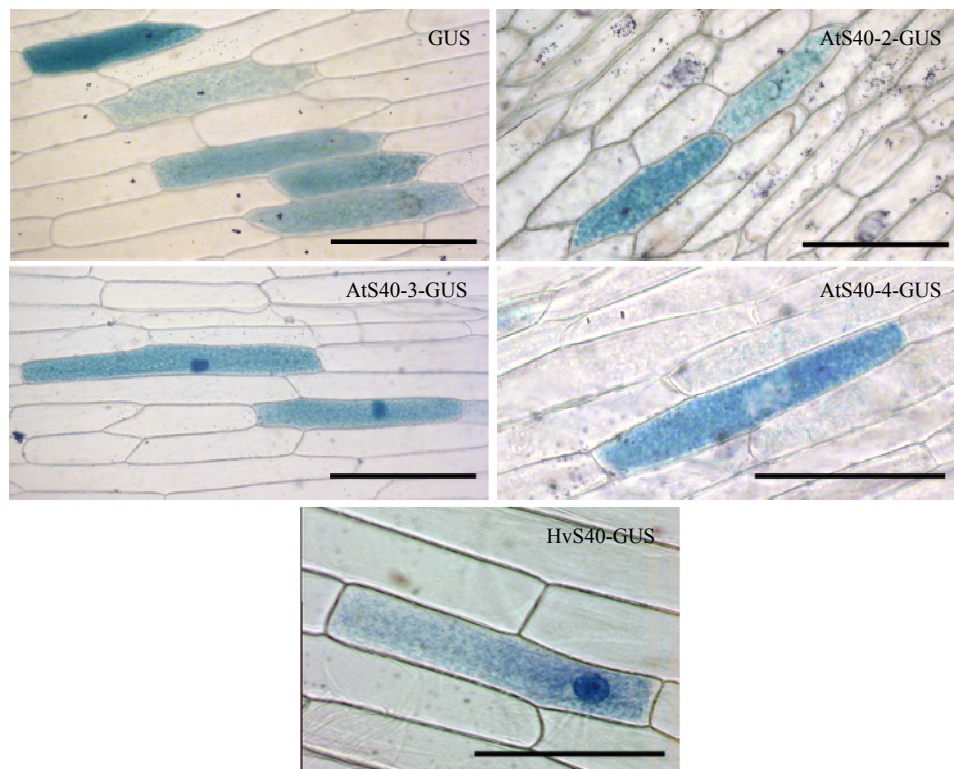


Abb. 23 Subzelluläre Lokalisation der AtS40-Proteine in Fusion mit GUS nach biolistischer Transformation von Zwiebelepidermiszellen. Als Referenz wurde das HvS40-GUS-Fusionskonstrukt verwendet (Krupinska *et al.* 2002). Der Nachweis erfolgte 24 h nach der Transformation durch eine GUS-Färbung. Der angegebene Maßstab entspricht 100 µm.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass das AtS40-3-Gen aus *A. thaliana* eine zum HvS40-Gen vergleichbare Expression aufweist (s. 3.4.3). Die beiden zugehörigen Proteine akkumulieren in transienten Ansätzen im Zellkern und besitzen hypothetische Phosphorylierungsstellen, sowie PEST-Sequenzen (Abb. 24). Im Gegensatz zum HvS40-Protein der Gerste verfügt das AtS40-3-Protein selbst jedoch über eine bisher bekannte NLS-Sequenz (Abb. 24). Aufgrund der Fusion mit GUS (68 kD) und dem daraus resultierenden Molekulargewicht (80,5 kD) ist eine passive Akkumulation im Zellkern jedoch auszuschließen. Obwohl es neben diesen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede in den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen gibt, könnte das AtS40-3-Protein eine zum HvS40-Protein vergleichbare Funktion besitzen.

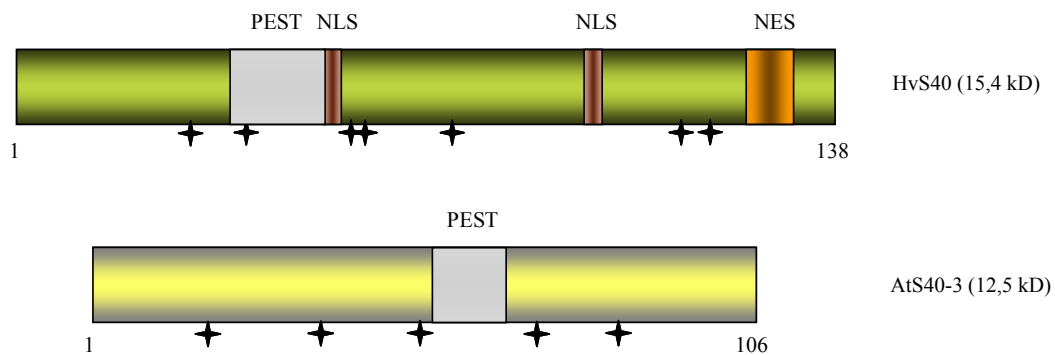


Abb. 24 Vergleich der Proteine HvS40 und AtS40-3. Dargestellt ist ein schematischer Aufbau der Proteine. Die NLS- und NES-Sequenzen sowie mögliche Phosphorylierungsstellen (Sterne) sind gekennzeichnet. Die hypothetische PEST-Sequenz ist grau unterlegt hervorgehoben. Das Molekulargewicht (kD) sowie die Anzahl der kodierenden Aminosäuren ist angegeben.

3.5 Analyse von T-DNA-Insertionslinien des *AtS40-3*-Gens

Im vorigen Kapitel wurde das *AtS40-3*-Gen aus der DUF584-Familie von *A. thaliana* aufgrund seiner Expression und der Lokalisation des zugehörigen Proteins im Zellkern als Gen identifiziert, das dem *HvS40*-Gen der Gerste funktionell entsprechen könnte. Um weitere Hinweise auf die Funktion des *AtS40-3*-Proteins in *A. thaliana* zu erlangen, wurden zwei T-DNA-Insertionslinien des Gens untersucht. Bei der funktionellen Charakterisierung war der Einfluss des *AtS40-3*-Proteins auf den Verlauf der Seneszenz von vorrangigem Interesse.

In der Δ_1 *AtS40-3*-Linie vom SALK-Institut (SALK_076786, s. 2.14) liegt die T-DNA-Insertion unmittelbar hinter der ‚TATA-Box‘ und ca. 100 Basenpaare vor dem Startkodon. Die Δ_2 *AtS40-3*-Linie aus dem GABI-Kat Projekt (GABI_669C11, s. 2.14) besitzt eine Insertion ca. 260 Basenpaare vor dem Startkodon, die sich zwischen zwei W-Box-Motiven befindet und stromaufwärts von zwei weiteren cis-Elementen (ABRE-Motiv, E-Box) liegt (Abb. 25). Der *AtS40-3*-Promotor verfügt wie auch der *HvS40*-Promotorbereich (s. 1.4) über mehrere W-Boxen. Im *HvS40*-Promotor liegen immer zwei W-Boxen in einem Abstand von 5 Basen zusammen, so dass sich zwei Motive bilden, die 200 Basen voneinander entfernt angeordnet sind (s. 3.6.1). Die W-Boxen des *AtS40-3*-Promotors zeigen keine vergleichbare Anordnung, sondern vier dieser sechs W-Boxen liegen jeweils zu zweit in einem Abstand von 12-24 Basen zueinander vor (Abb. 25). Diese zwei angeordneten Motive werden von ca. 330 Basen getrennt. Keines dieser Motive weist jedoch eine mit den ERE-Elementen vergleichbare Sequenzanordnung auf, wie sie im Promotorbereich des *HvS40*-Gens zu finden ist (s. 1.4). Der *AtS40-3*-Promotor besitzt neben den W-Boxen weitere cis-Elemente, die auch in den Promotorbereichen der übrigen *AtS40*-Gene vorkommen und somit keine für den *AtS40-3*-Promotor spezifischen Elemente zu sein scheinen.

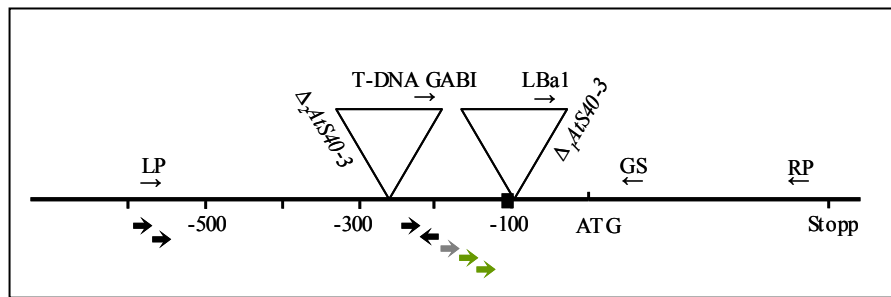


Abb. 25 Schematische Darstellung des *AtS40-3*-Promotors. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Promotors, in dem durch Pfeile die Positionen von drei *cis*-Elementen angegeben sind: W-Box (schwarz), ABRE-Motiv (grün) und E-Box (grau) in Relevanz zu den T-DNA-Insertionen (Dreiecke). Die TATA-Box an Position -100 bp ist als schwarzer Kasten angegeben. Die Positionen der Oligonukleotide LP, RP, LBA1, T-DNA GABI und GS, die für die Untersuchung des Genotyps der Linien eingesetzt wurden (s. 2.3, Tab. 4), sind als kleine Pfeile angegeben.

Die für den Versuchsansatz gewählten Pflanzen der T3-Generation wurden auf die homozygote Insertion der T-DNA überprüft. Dazu wurden die Pflanzen angezogen und deren Genotyp bezüglich der T-DNA-Insertion nach Isolierung der genomischen DNA mit genspezifischen Oligonukleotiden und einem für die T-DNA spezifischen Oligonukleotid durch PCR untersucht. Anhand der PCR-Analyse konnte festgestellt werden, dass die für die phänotypische Analyse verwendeten Pflanzen homozygot waren (Abb. 26).

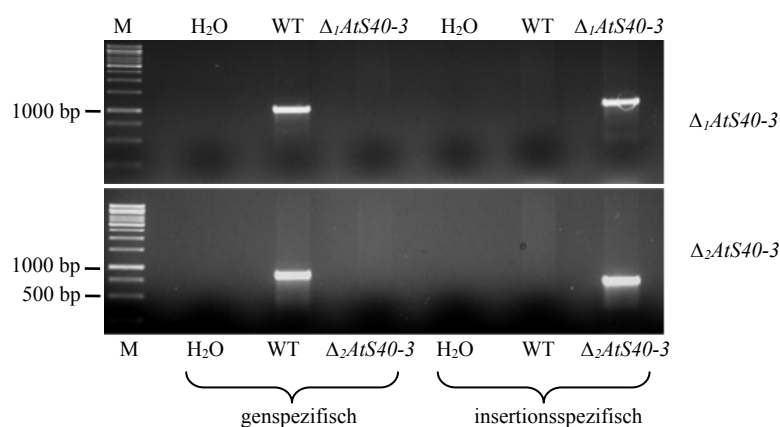


Abb. 26 Analyse homozygoter T-DNA-Linien des *AtS40-3*-Gens. Genomische DNA 6 Wochen alter Pflanzen des Wildtyps *A. thaliana* Col-0 und der zwei Insertionslinien wurde isoliert und für die PCR eingesetzt. Folgende spezifische Oligonukleotide (s. Abb. 34) wurden verwendet: $\Delta_1\text{AtS40-3}$: genspezifisch LP+RP, insertionsspezifisch LBA1+RP; $\Delta_2\text{AtS40-3}$: genspezifisch GS+LP, insertionsspezifisch GS+T-DNA GABI. Abgebildet ist ein 1%iges [w/v] Agarosegel. Als Marker (M) wurde der 1 kb DNA-Ladder (MBI Fermentas) verwendet. H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von DNA.

3.5.1 Analyse des Phänotyps im Verlauf der Seneszenz

Die T-DNA-Insertionslinien $\Delta_1\text{AtS40-3}$ und $\Delta_2\text{AtS40-3}$ wurden im Vergleich zum Wildtyp *A. thaliana* anhand einer Kinetik über 11 Wochen auf einen seneszenzspezifischen Phänotyp untersucht. Um die einzelnen Blätter einer Pflanze im Verlauf der Entwicklung voneinander unterscheiden zu können, wurden die ersten 16 Blätter von je 5 Pflanzen jeder Linie nach Ausbildung der Primärblätter jede Woche mit farbigen Bändern markiert. Die Pflanzen der ersten zwei Wochen waren noch Keimlinge und wurden deshalb nicht mit in die Analyse einbezogen. Betrachtet man den Verlauf der Entwicklung einer Linie und den Habitus gleich alter Pflanzen zueinander, so ist zu erkennen, dass sich die Pflanzen des Wildtyps und der $\Delta_2\text{AtS40-3}$ -Linie nicht unterscheiden (Abb. 27). Die Pflanzen der $\Delta_1\text{AtS40-3}$ -Linie sind in Woche 10 grüner und haben einen größeren Blütenstand entwickelt als der Wildtyp.



Abb. 27 Phänotypische Analyse der T-DNA-Linien des *AtS40-3*-Gens. Untersucht wurden die zwei Linien $\Delta_1\text{AtS40-3}$ und $\Delta_2\text{AtS40-3}$ im Vergleich zum Wildtyp *A. thaliana*. Abgebildet sind Pflanzen im Alter von 3 bis 11 Wochen. Die Pflanze der $\Delta_1\text{AtS40-3}$ -Linie ist in Woche 10 mit einem Pfeil markiert.

Um diese Linien im Hinblick auf die Seneszenz näher zu charakterisieren, wurden die markierten Blätter der Wochen sechs bis zehn untersucht (Abb. 28). Die Wochen drei bis fünf fanden dabei keine Berücksichtigung, da in diesen Stadien noch keine seneszenten Blätter vorhanden waren. Sowohl im Wildtyp als auch in den T-DNA-Linien ist ab der sechsten Woche schon eine beginnende Vergilbung der ältesten Blätter zu erkennen. Die Vergilbung schreitet in den Wochen sieben und acht im Wildtyp schneller voran als in den beiden Insertionslinien. Ab der neunten Woche ist zwischen der $\Delta_2\text{AtS40-3}$ -Linie und dem Wildtyp kein Unterschied mehr erkennbar, während die $\Delta_1\text{AtS40-3}$ -Linie deutlich langsamer senesziert. Auch in der zehnten Woche waren bei allen 5 untersuchten Pflanzen der $\Delta_1\text{AtS40-3}$ -Linie noch alle Blätter vorhanden, während im Wildtyp schon einzelne abgestorben waren (Abb. 28). Die phänotypische Untersuchung der zwei T-DNA-Insertionslinien $\Delta_1\text{AtS40-3}$ und $\Delta_2\text{AtS40-3}$ lässt die Vermutung zu, dass die Insertionen in den Linien zu einem veränderten Seneszenzverlauf im Vergleich zum Wildtyp führen.

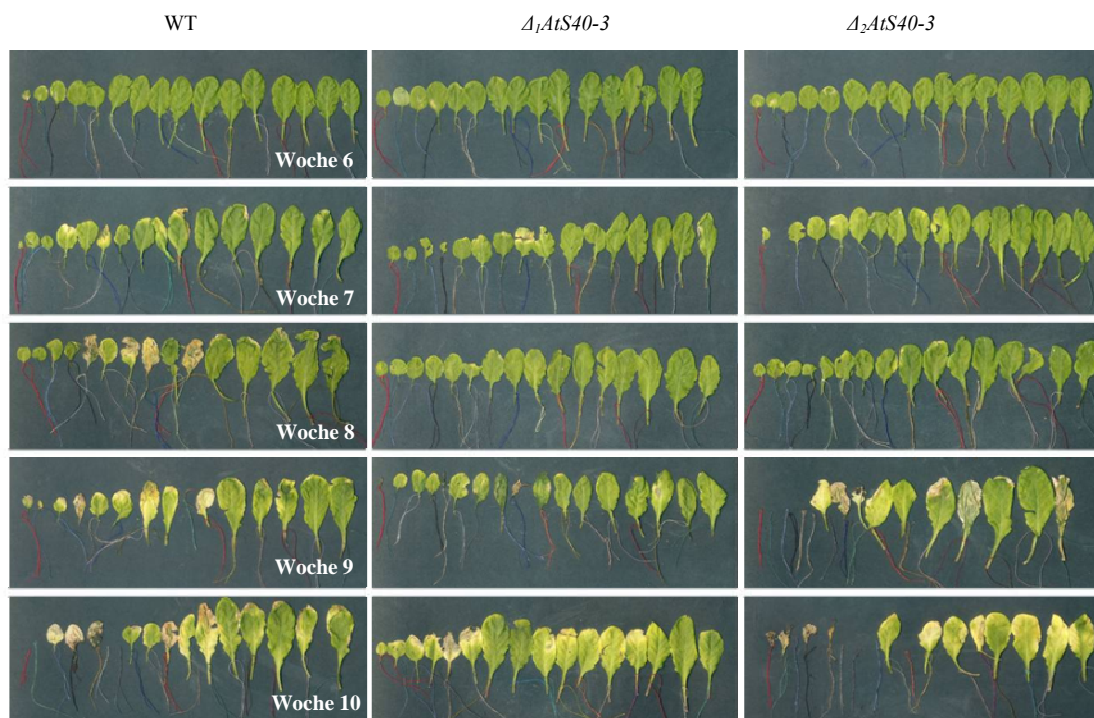


Abb. 28 Phänotypische Analyse der T-DNA-Linien $\Delta_1\text{AtS40-3}$ und $\Delta_2\text{AtS40-3}$ im Vergleich zum Wildtyp. Die ersten 16 Blätter, die nach Entwicklung der Primärblätter in den Wochen sechs bis zehn gebildet wurden, fanden für die Analyse Verwendung, wobei sich jeweils die alten Blätter links und die jüngsten Blätter rechts im Bild befinden.

3.5.2 Expression des *AtS40-3*-Gens in den Insertionslinien

Die T-DNA-Insertionen liegen in beiden Linien im Promotorbereich des *AtS40-3*-Gens vor. Um zu untersuchen, ob in den homozygoten Linien die Expression des Gens durch die Lage der Insertionen beeinflusst ist, wurde die Akkumulation des *AtS40-3*-spezifischen Transkripts in einzelnen Entwicklungsstadien mittels RT-PCR getestet. Da das *AtS40-3*-Gen während der Seneszenz eine erhöhte Expression aufweist, wurde aus den Rosetten der Pflanzen in der sechsten (nicht seneszent), achten (seneszent) und zehnten (stark seneszent) Woche RNA isoliert und cDNA synthetisiert.

Die Charakterisierung der Stadien erfolgte durch die Analyse der Expression des Gens *lhca1*, das für ein Chlorophyll a/b-Bindeprotein kodiert und des Seneszenzmarkergens *SAG12* (Abb. 29). Es ist zu erkennen, dass die Transkriptmenge des *lhca1*-Gens in allen Linien im Verlauf der Seneszenz gleichermaßen abnimmt. Das *SAG12*-spezifische Transkript scheint im Wildtyp ab der Woche 6 zu akkumulieren, während es in den beiden Insertionslinien erst ab Woche 8 nachweisbar ist. In der $\Delta_2\text{AtS40-3}$ -Linie ist die nachweisbare Transkriptmenge des *SAG12*-Gens in der Woche 8 vergleichbar zum Wildtyp, wobei sie in Woche 10 im Wildtyp höher ist. Die $\Delta_1\text{AtS40-3}$ -Linie zeigt dagegen eine deutlich schwächere Transkriptakkumulation des *SAG12*-Gens, die erst ab Woche 10 gut nachweisbar ist. Es können also sowohl durch die phänotypische Analyse als auch auf molekularer Ebene Hinweise auf verzögerte Seneszenzprozesse gefunden werden. Betrachtet man jedoch die Expression des *At40-3*-Gens, so ist die detektierte Transkriptmenge in den T-DNA-Insertionslinien vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 29).

Anhand der semiquantitativen RT-PCR lässt sich nicht zweifelsfrei klären, ob die Expression des *AtS40-3*-Gens durch die T-DNA-Insertion beeinträchtigt ist. Trotzdem scheint die T-DNA-Insertion im Promotorbereich des Gens in beiden Linien zu einer Verzögerung der Seneszenz im Vergleich zum Wildtyp zu führen, wobei der Effekt bei der $\Delta_1\text{AtS40-3}$ -Linie deutlicher ausgeprägter als bei der $\Delta_2\text{AtS40-3}$ -Linie ist.

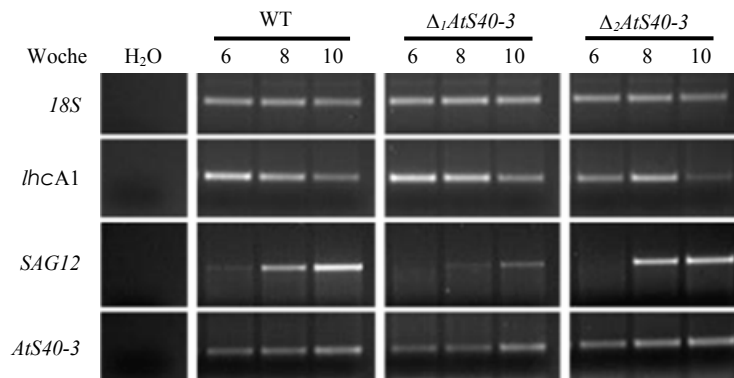


Abb. 29 Nachweis des AtS40-3-Transkripts in den Linien $\Delta_1\text{AtS40-3}$ und $\Delta_2\text{AtS40-3}$. Die RNA wurde aus 6, 8 und 10 Wochen alten Pflanzen isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. 18S rRNA = Beladungskontrolle, lhca1 = Gen für ein Chlorophyll a/b-Bindeprotein, SAG12 = Seneszenzmarkergen, H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

3.6 Regulation der Expression des *HvS40*-Gens

Die Expression des *HvS40*-Gens wurde bereits gut untersucht. So ist bekannt, dass die Expression des Gens durch diverse Formen von biotischem und abiotischem Stress gefördert werden kann (s. 1.4). Die Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Gens beteiligt sind, sind jedoch unbekannt. In einer vorangegangenen Arbeit konnte ein Transkriptionsfaktor der Whirly-Proteinfamilie isoliert werden, der an einen Abschnitt des *HvS40*-Promotors bindet (Dähnhardt 2003). Hier soll eine detaillierte Analyse des Promotorbereichs des *HvS40*-Gens durchgeführt werden. Des Weiteren sollen Untersuchungen zur Charakterisierung der Whirly-Proteine Aufschluss über ihre Funktion geben.

3.6.1 Promotoranalyse des *HvS40*-Gens

Um mögliche Hinweise auf die Regulation des *HvS40*-Gens zu erhalten, wurde der Promotorbereich mit Hilfe des Programms 'PLACE Signal Scan Search' (s. 2.14) auf putative Bindemotive für Proteine untersucht.

Als *HvS40*-Promotor wurde das Fragment von 840 bp analysiert (Haußühl 1998, Dähnhardt 2003). Auf dieser Sequenz konnten sowohl auf dem kodierenden als auch auf dem nicht kodierenden Strang verschiedene putative Bindestellen für Proteine identifiziert werden, die im Folgenden kurz beschrieben und in Abbildung 30 in der Promotor-Sequenz angegeben sind.

Im Bereich des *HvS40*-Promotors sind eine Reihe von ABRE-Motiven („ABA-responsive-element“) zu finden, die auf eine Expression des *HvS40*-Gens während der Keimung (Nakashima *et al.* 2006) hinweisen. Die ACGT-Elemente, die zusammen mit den (CA)_n-Elementen im Promotor vorkommen, können ebenfalls an der Keimung beteiligt sein und dort eine für Embryo und Endosperm spezifische Expression hervorrufen (Kang und Singh 2000). Außerdem sind ABRE- und DPBF-Core-Sequenzen („Dc3-promoter-binding factor“, ACACNNG), an die bZIP- Transkriptionsfaktoren binden können, in die Abscisinsäure-abhängige Expression involviert (Finkelstein und Lynch 2000). Ebenfalls vorhanden sind zwei potentielle Bindestellen (TGTC A) für einen „Homeodomain“-Transkriptionsfaktor, der an der Pathogenantwort beteiligt ist (Luo *et al.* 2005). Im *HvS40*-Promotor kommen die Motive sogenannter E-Boxen vor, an die basische Helix-Loop-Helix Proteine binden, die eine funktionell diverse Gruppe von Transkriptionsfaktoren darstellen (Buck und Atchley 2003). Beispielsweise gehören dieser Gruppe Proteine an, die in Prozesse wie Apoptose und zelluläre Seneszenz involviert sind (Ruzinova und Benezra 2003). Auch potentielle Bindestellen für MYB- (C/TAACNA/G) und MYC- (CANNTG) Transkriptionsfaktoren, die in diverse Prozesse des abiotischen Stresses involviert sind (Urao *et al.* 1993), befinden sich in dem Bereich des *HvS40*-Promotors.

Des Weiteren kommen im *HvS40*-Promotor vier W-Boxen (GTCA-Core) an den Positionen -401, -412, -614 und -625 vor, die Bestandteil des Motivs 1 und 2 sind, die eingangs erläutert wurden und im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse sind (s. 1.4). Auffällig ist, dass jeweils zwei W-Boxen im Abstand von 5 Basen eng zusammen liegen und diese beiden Paare durch 200 Nukleotide getrennt sind (Abb. 30). An die W-Boxen können unter anderem WRKY-Transkriptionsfaktoren binden, die als Aktivatoren oder Repressoren von Genen fungieren, die in Prozesse wie die Pathogenabwehr und die Seneszenz involviert sind (Eulgem *et al.* 2000, Laloi *et al.* 2004).

Eingangs wurde bereits beschrieben, dass die W-Boxen in ihrer Sequenz mit dem ERE-Element („elicitor responsive element“) des *PR10a*-Gens der Kartoffel überlappen. Dieses ERE-Element besteht aus zwei „Inverted repeats“ (IR1, IR2) mit der Sequenz TGACAnnnnTGTC A, die essentiell für die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren ist. Das Motiv 1 des *HvS40*-Promotors besitzt nur eine IR2-Sequenz (Position -625), während das Motiv 2 sowohl eine IR2-Sequenz (Position -412) als auch eine IR1-ähnliche-Sequenz besitzt. (Position -421, Abb. 30).

Der *HvS40*-Promotor verfügt also über verschiedene Arten von Sequenzmotiven, die für eine komplexe Regulation des Gens sprechen. Es konnte bereits ein Transkriptionsfaktor der Whirly-Proteine isoliert werden, der an das Motiv 2 des Promotors bindet (Dähnhardt 2003) und in den folgenden Kapiteln charakterisiert wird.

CCGCGGGCCT	<u>AACCAGAATA</u>	AGTCCCAATA	AGCTCCTATT	AAAGAGTCTT	ATTTGATAAG	-781
	MYBI					
TCCCAAATAA	CCATAATAAG	TCCCAATAAG	TCCCTTGTGT	TTGATTTAGG	TGGGACTTAT	-721
AGGAACTTTT	TTAAGTCTTA	<u>AAACCAATAA</u>	GTCCCTAGAA	<u>ACAAACACCC</u>	TCTAGGTCGT	-661
		MYBI		2x(CA) _n		
			Motiv 1			
CCTATGTTTG	GGGTACTAT	TTCAATTTGT	<u>ATGTCAGAAA</u>	<u>ATGGTCA</u> AAAT	GAGTTTGAAC	-601
			TGTC-Box/W-Box/IR2	W-Box		
CGGTCCGTAC	<u>GTGGCATCAA</u>	TCTAGTGAGT	TGGT <u>ACGTGC</u>	ATGATTCCTT	CCTCCAAATT	-541
	ABRE/ACGT-Motiv		ACGT-Motiv			
AAGCTTACAT	<u>GTGCGTTATC</u>	AATGAATATG	TTACTGTATG	AAAGTGCCTA	AAAAAACTTG	-481
	E-Box/MYC					
TTGCTATCAA	TGGGATTGGC	TAGCACTAAG	TTCCGAGCCA	ACCTATCTTG	CCGTG <u>TGAGA</u>	-421
					IR1-ähnlich	
	Motiv 2					
<u>ACTCTGTCAA</u>	<u>ATATTGGTCA</u>	AACGAAGCAA	GTTTACACAG	GACAGAAATT	CCGCCATTGG	-361
	TGTC-Box/W-Box/IR2	W-Box	DPBF-Core			
TAAGTAGGAC	GATACGCGTG	CAAAT <u>ACGTA</u>	<u>CGTACATACG</u>	TGCACACCTG	TACCAGGCGC	-301
		2x ACGT-Motif		DPBF-Core/E-Box		
<u>ACGTCCACGT</u>	GGCAGCCGAG	GATAGGGTGT	ACCGCACTCC	ACATCAACCC	CTTCCTTCCT	-241
	ABRE/E-Box/MYC					
TCCATCCCAG	GCGCAGGCAG	AGACACCCAC	AGCTAGCAAA	GTTTGTCCAA	ACGCGCCACT	-181
ACTCCTCCTC	<u>CAGTTGCCAA</u>	CTCCCCAAGG	AAGTCTGCTT	GCTCACCAAG	ACACGCCATC	-121
	E-Box					
GTCTCCTTCT	CCAATCTCCA	TCCCCTTCCT	TCCACAGCAC	<u>ACCTACCTTC</u>	GCTCGCTATA	- 61
				MYB	TATA-Box	
<u>TATGCCCCCTC</u>	GCCATGGCAG	CCCCAGCTCT	TGCCTTCCCG	<u>GACACACGGC</u>	CGGGGAGGCC	- 1
			Transkriptionsstart	DPBF-Core		

Abb. 30 Genomische DNA-Sequenz aus dem Bereich des HvS40-Promotors. Abgebildet ist nur der kodierende Strang der Sequenz. Angegeben sind die Sequenzmotive, die mittels ‚PLACE Signal Scan Search‘ sowohl für den kodierenden als auch für den nicht kodierenden Strang analysiert wurden. Die Motive verschiedener potentieller Bindestellen von Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen hervorgehoben. Überlappende Sequenzmotive wurden nicht separat kenntlich gemacht, sondern durch die Angabe der Motive an gleicher Position dargestellt. Die für die Untersuchungen wichtigen Motive 1 und 2 sind gelb unterlegt abgebildet.

3.6.2 Bindung des HvWhy1-Proteins an Nukleinsäuren

Das Whirly1-Protein aus Gerste (HvWhy1) wurde aus Zellkernen 5 Tage alter Primärblätter der Gerste durch die Bindung an das Motiv 2 des HvS40-Promotors isoliert (Dähnhardt 2003). Zum Nachweis der Bindung des Proteins an DNA wurden Gelretardierungsexperimente (EMSA) verwendet. Dafür markiert man die zu untersuchenden DNA-Bereiche radioaktiv und inkubiert diese mit den Proteinen. Entstehen DNA-Protein-Komplexe, wandern diese im Vergleich zur ungebundenen DNA in einem nativen Polyacrylamidgel langsamer.

Das Motiv 2 beinhaltet eine W-Box und zwei ‚inverted repeat‘ (IR)-Sequenzen, die als ERE-Element bezeichnet werden (Després *et al.* 1995). Der HvS40-Promotor besitzt ein weiteres Element, das als Motiv 1 (M1) bezeichnet wird und nur aus einer IR-Sequenz und einer W-Box besteht (Abb. 31). Zur Isolierung des HvWhy1-Proteins aus Zellkernen wurde als Oligonukleotid eine kurze Sequenz des Motivs 2 (M2) verwendet, die nur die W-Box und die IR2-Sequenz beinhaltet (Dähnhardt 2003). Um mit Hilfe von überexprimiertem HvWhy1-Protein diese Bindung in Gelretardierungsexperimenten zu verifizieren, wurde in dieser Arbeit für die Bindung ein Oligonukleotid, das das gesamte Motiv 2 enthält, eingesetzt. Des Weiteren wird geprüft, ob das HvWhy1-Protein auch an das Motiv 1 (M1), das mit der Sequenz aus IR2 und W-Box dem Motiv 2 sehr ähnelt (Abb. 31), bindet. Die Whirly-Proteine wurden bisher als Einzelstrang-bindende Proteine beschrieben. Es wurden sowohl der kodierende Strang (CS), der nicht kodierende Strang (NCS) als auch doppelsträngige DNA (DS) der Motive 1 und 2 für die Gelretardierungsexperimente eingesetzt (Abb. 31). Zur Überexpression des HvWhy1-Proteins in *E. coli*-Zellen wurde die EST-Sequenz BF625136 (‚expressed sequence tag‘) verwendet. Diese Sequenz repräsentiert nicht die vollständige kodierende Sequenz für das HvWhy1-Protein, jedoch war N-terminal in der abgeleiteten Aminosäuresequenz zumindest das charakteristische Motiv KGKAAL, das für die DNA-Bindeaktivität verantwortlich ist, vorhanden (s. 1.4 und Abb. 34).

M1-CS	5'-TATTTCAATTTGTA <u>TGTC</u> AGAAAATGGTCAAATG-3'	IR2	W-box	
M1-NCS	5'-CATTTGACCA <u>TTTTCTGAC</u> ATACAAATTGAAATA-3'	W-box	IR2	
M2-CS	5'-CCGTGTGAGAACTCTGTCAAATATGGTCAAACG-3'	IR1	IR2	W-box
M2-NCS	5'-CGTTTGACCAATATTTGACAGAGTCTCTACACGG-3'	W-box	IR2	IR1

Abb. 31 Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Analyse der Motive M1 und M2 aus dem Bereich des HvS40-Promotors in den Gelretardierungsexperimenten eingesetzt wurden. Abgebildet sind jeweils der kodierende Strang (CS) und der nicht kodierende Strang (NCS). Die W-Box und die IR-Sequenzen sind unterstrichen abgebildet.

Das überexprimierte HvWhy1-Protein in der Lage ist, an beide Motive zu binden (Abb. 32). Es ist eine starke Bindung sowohl an den kodierenden als auch an den nicht kodierenden Strang der Motive 1 und 2 aus dem Bereich des *HvS40*-Promotors nachweisbar. Die Bindung an die doppelsträngige DNA ist dagegen sehr schwach.

Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurde in Kompetitionsansätzen nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid (kalte DNA) im Überschuss hinzugegeben. Dadurch wird die Bindung an das radioaktiv markierte Oligonukleotid schwächer, da das Protein vorzugsweise an die im Überschuss vorhandenen nicht markierten Oligonukleotide bindet. Dies ist in Abbildung 32 durch eine Abschwächung bis hin zum Verschwinden des Signals erkennbar.

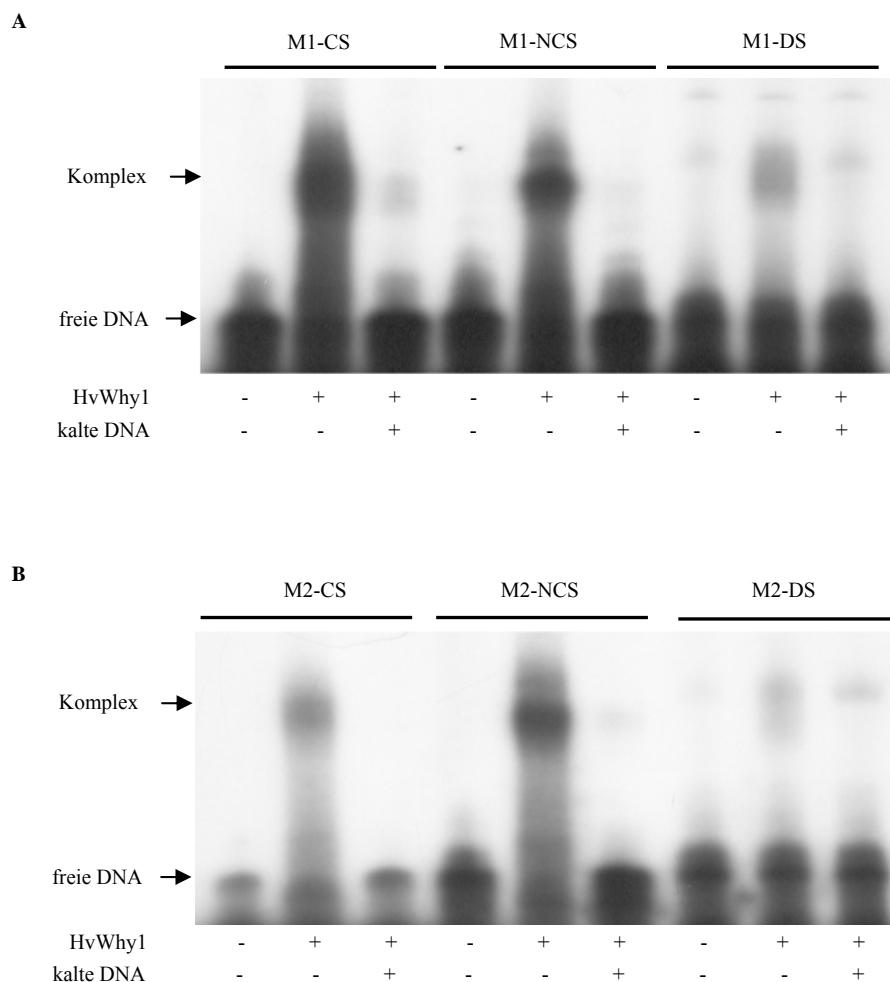


Abb. 32 Bindung des HvWhy1-Proteins an die Motive des *HvS40*-Promotors. Das Gelretardierungsexperiment wurde mit den radioaktiv markierten (A) M1 und (B) M2 Oligonukleotiden und 200 ng des überexprimierten, aufgereinigten HvWhy1-Proteins durchgeführt. Doppelsträngige DNA (DS) wurde durch die Hybridisierung der Einzelstränge (CS, NCS) erzeugt. Die nicht radioaktiv markierte DNA (kalte DNA) wurde in 50-facher Menge hinzugegeben. Abgebildet sind Autoradiogramme nativer Polyacrylamidgele nach Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe und Trocknung der Gele.

Als zusätzliches DNA-Bindemotiv wurde das charakteristische Heptanukleotid TTAGGG pflanzlicher Telomere untersucht. Von AtWhy1 ist bekannt, dass es an Telomersequenzen bindet und damit die Telomeraseaktivität reguliert (Yoo *et al.* 2007). Es soll analysiert werden, ob das HvWhy1-Protein an die Telomersequenz binden kann. Dabei wurde die Telomersequenz in vierfacher Wiederholung verwendet und die Sequenz sowohl in 5'-Orientierung, als auch in 3'-Orientierung und in doppelsträngiger Form auf die Bindung des Why1-Proteins untersucht. Dabei konnte eine Affinität des HvWhy1-Proteins an beide Einzelstränge ermittelt werden. Auch hier war die Bindung an den Doppelstrang sehr schwach (Abb. 33).

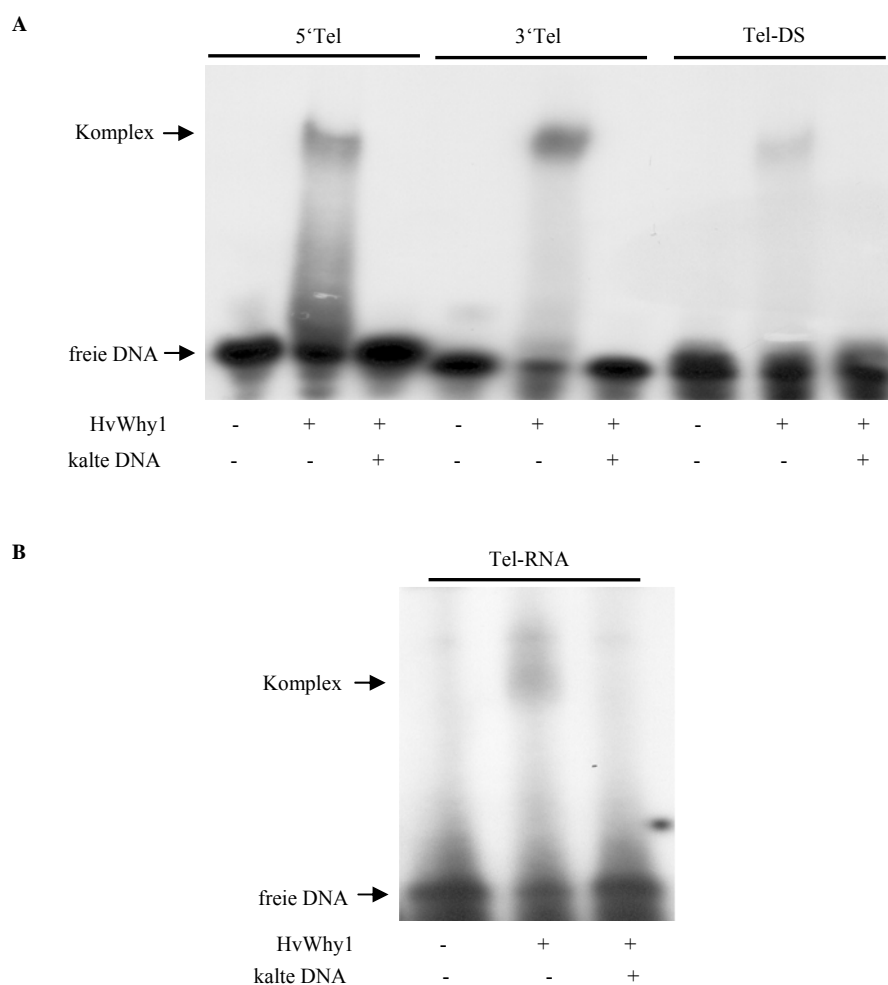


Abb. 33 Bindung des HvWhy1-Proteins an Telomersequenzen. Die Gelretardierungsexperimente wurden mit den radioaktiv markierten **(A)** Telomer Oligonukleotiden (4xTTAGGG) und dem **(B)** Telomer-RNA Oligonukleotid (4xCUAAACCCUAAA), sowie 200 ng des überexprimierten aufgereinigten HvWhy1-Proteins, durchgeführt. Doppelsträngige DNA (Tel-DS) wurde durch die Hybridisierung der Einzelstränge (5'- und 3'-Orientierung) erzeugt. Die nicht radioaktiv markierte DNA (kalte DNA) wurde in 50-facher Menge hinzugegeben. Abgebildet sind Autoradiogramme nativer Polyacrylamidgele nach Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe und Trocknung der Gele.

Neben der Affinität zu den Telomersequenzen wurde auch die Bindung zu einer RNA-Sequenz getestet, die von der Telomerase als Matrize (CUAAACCCUAAA) verwendet wird. Das HvWhy1-Protein scheint an die RNA zu binden, jedoch mit wesentlich geringerer Affinität als an einzelsträngige DNA (Abb. 33). Das HvWhy1-Protein kann also in der überexprimierten Form mit hoher Affinität an DNA-Einzelstrang und mit geringerer Affinität an DNA-Doppelstrang und an RNA binden. Dabei ist zu beachten, dass die schwache Bindung in den Ansätzen mit den DNA-Doppelsträngen auf noch vorhandene Einzelstränge in der Probe zurückzuführen sein kann (s. 2.7.2).

3.7 Charakterisierung der Whirly-Proteine

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins zum erstmals beschriebenen StWhy1 aus Kartoffel (AF233342) und den drei Whirly-Proteinen aus *A. thaliana* verdeutlicht, dass diese Proteine über große Bereiche der Sequenz identisch sind und eine Reihe funktionell ähnlicher Aminosäuren besitzen (Abb. 34). Alle Sequenzen verfügen über die charakteristische DNA-Bindedomäne KGKAAL. Die Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins weist eine Homologie von 63 % zu AtWhy1 (At1g14410) und StWhy1 auf, während es zu AtWhy3 (At2g02740) eine Homologie von 65 % und zu AtWhy2 (At1g71260) von 39 % besitzt. Das AtWhy1-Protein hat die höchste Homologie (68 %) zum StWhy1. AtWhy2 und AtWhy3 hingegen haben nur eine Sequenzhomologie von 47 % und 30 % zu StWhy1. Dabei sind die Sequenzen von AtWhy1 und AtWhy3 zu 77 % identisch, die Sequenzen von AtWhy1 und AtWhy2 jedoch nur zu 36 %. AtWhy2 hat nur eine 33 %ige Homologie zu AtWhy3. Die Sequenzen scheinen sich im N-terminalen Bereich deutlich voneinander zu unterscheiden. Der Sequenzvergleich der Whirly-Proteine zeigt, dass die aus der EST-Sequenz BF625136 abgeleitete Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins, N-terminal nicht vollständig ist (Abb. 34). Falls das HvWhy1-Protein aus Gerste tatsächlich eine Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern ausübt, ist eine Lokalisation im Zellkern erforderlich. Zur Ermittlung der voraussichtlichen Lokalisation wurden zunächst die Sequenzen der drei Whirly-Proteine aus *A. thaliana* untersucht. Mit Hilfe der Programme ‚PredictNLS‘, ‚iPSORT‘ und ‚TargetP‘ (s. 2.14) wurden in den Aminosäuresequenzen der Proteine keine signifikanten Kernlokalisierungssignale (NLS) gefunden, jedoch konnten für AtWhy1 und AtWhy3 N-terminal plastidäre Importsequenzen und für AtWhy2 eine mitochondriale Importsequenz vorhergesagt werden (Tab. 9, Abb. 34). Es ist anzunehmen, dass die aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz des HvWhy1-Proteins eine derartige Importsequenz fehlt.

HvWhy1		-----
StWhy1	1	-MSNFSLSPTSSTGFSNLQNPTKTSYLSFSSSINTIFAPLSSNTTKSFSGLTHKAALPR
AtWhy1	1	-----MSQLLSTPLMAVNSNPRFLSSSSSVLVGGFAVKRHGFALKPTTKTVKL
AtWhy3	1	-----MSQLSSPPMAVFSKTFINHKFSADARFLSSHSLTSGGFAGKIIPLKPTARL
AtWhy2	1	-----MMKQARSLLSRSLCDQSKSLF
HvWhy1	1	-----EREPPVPGGQAGRVFVSYSIYKGAALAFDPRPQFVPLES
StWhy1	60	NLSLTCRHSDYFEPQQQQQQQQPQGASTPKVFVGYSIYKGAALTVEPRSPERFPLDS
AtWhy1	49	FSVKSQRTDYFEKQRFQDSSSSPSPAEGLPARFYVGHYSIYKGAALTVDPRAPFVVALDS
AtWhy3	53	KLTVKSRQSDYFEKQRFQDSSSSQNAEVSSPRFYVGHYSIYKGAALTIEPRAPFVVALDS
AtWhy2	22	EASTLRGFASWSNSTPGRGFGKDAAKPSGRLEFAPYSIFKGAALSVBPVLPSTETDS
HvWhy1	42	GAYKVAKEGCVLLQFAPAVGPRQYDWARQVFSLSVWEMGTLTLLGLTDSCEFFHDPFKG
StWhy1	120	GAFKLSREGVMVLOFAPAAAGVROYDWSRKQVFSLSVTEIGSIISLGAKDSCEFFHDPNKG
AtWhy1	109	GAFKLSKDGFLLOFAPSAAGVROYDWSRKQVFSLSVTEICTLVSLGPRESCFEFFHDPFKG
AtWhy3	113	GAFKLTKEGFLLOFAPAAAGVROYDWSRKQVFSLSVTEIGNLVSLGPRESCFEFFHDPFKG
AtWhy2	82	CNLRIDRRGSLMMTFMPAIGERKYDWEKKQKFALESPTGVGLISMGSKDSCEFFHDPMSK
HvWhy1	102	R-SDEGVRKVLKVEPTPDGNGRFNLSVQNRLNVDENIYIPITKGEAVIVSTFNYYII
StWhy1	180	R-SDEGVRKVLKVEPLPDGSGHFFNLSVQNKLINLDENIYIPVTKAEFAVLVSANFVFM
AtWhy1	169	K-SDEGVRKVLKVEPLPDGSGHFFNLSVQNKLVNVDESIYIPITRAEFAVLISAFNFVL
AtWhy3	173	KGSDEGVRKVLKVEPLPDGSGRFNLSVQNKLVNVDSEVYIPITKAEFAVLISAFNFVL
AtWhy2	142	S-SNAGVRKSLSVKPHADGSGCYFISLSVNNSILKTNDFYFVVPVTKAEFAVMKTAFSFAL
HvWhy1	161	PHIMGWSTFTNSIKPEESQPYN--RPQSS--PELEWRR
StWhy1	139	PYLIGWHTAVNSFKPEDASRSNNANPRSG--AELEWNR
AtWhy1	228	PYLIGWHAFANSIKPEETS RVNNA SPNYG--GDYEWNR
AtWhy3	133	PHLIGWAFANSIKPEDSNRLNNA SPKYG--GDYEWNR
AtWhy2	201	PHIMGNRLTGHVNTALPSRNVSHLKTEPQLELEWDK

Abb. 34 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Whirly-Proteine. Abgebildet ist die Sequenz des HvWhy1-Proteins der Gerste im Vergleich zum StWhy1-Protein aus *Solanum tuberosum* und zu den Whirly-Proteinen aus *A. thaliana*. Identische Aminosäuren aller Sequenzen zueinander sind blau, ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt, abgebildet. Der Sequenzvergleich wurde mit 'ClustalW' erstellt (Thompson *et al.* 1994). Die vorhergesagten Importsequenzen der Whirly-Proteine aus *A. thaliana* (Tab. 9) sind kursiv dargestellt. Das DNA-Bindemotiv KGKAAAL ist unterstrichen.

Die theoretisch ermittelten Lokalisationen der Whirly-Proteine stehen im Widerspruch zu den biochemischen Untersuchungen, die die Whirly-Proteine AtWhy1 und StWhy1 als DNA-Bindeproteine im Zellkern beschreiben (s. 1.4). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die mehr als eine Lokalisation innerhalb einer Zelle aufweisen und als 'dual targeting'-Proteine bezeichnet werden (Silva-Filho 2003, Schwacke *et al.* 2007). Daher soll nachfolgend die subzelluläre Lokalisation der Whirly-Proteine aus *A. thaliana* untersucht werden.

Tab. 9 Voraussichtliche subzelluläre Lokalisation und proteolytische Schnittstellen der Importsequenzen der Whirly-Proteine von *A. thaliana*. Verwendet wurde das Programm 'TargetP'. Zeichenerklärung: Wahrscheinlichkeit (0 bis 1, 1= höchste Wahrscheinlichkeit) der Lokalisation im (cTP) Chloroplast, (mTP) Mitochondrium, und in (Andere) anderen Intrazellulären Räumen; (AS) Aminosäure; (MG) Molekulargewicht in Kilodalton [kD].

Protein	Gen	AS	Score			Lokalisation	Schnittstelle	MG[kD]
			cTP	mTP	Andere			
AtWhy1	<i>At1g14410</i>	263	0,654	0,082	0,083	Chloroplast	AS 47	29
AtWhy2	<i>At1g71260</i>	238	0,203	0,247	0,127	Mitochondrium	AS 29	26
AtWhy3	<i>At2g02740</i>	268	0,617	0,062	0,177	Chloroplast	AS 75	29

3.7.1 Lokalisation der Whirly-Proteine aus *A. thaliana*

Mit Hilfe von *gfp*-Konstrukten soll unter Kontrolle des 35S CaMV-Promotors untersucht werden, ob die Whirly-Proteine aus *A. thaliana* eine duale Lokalisation aufweisen. Hierfür wurden Protoplasten der Kartoffel und Zwiebelepidermiszellen transient mit den unterschiedlichen Konstrukten transformiert und am Konfokalen Mikroskop (CLSM, 'confocal laser scanning microscopy') analysiert.

Die Fusionsproteine AtWhy1-GFP und AtWhy3-GFP akkumulierten sowohl in den Protoplasten der Kartoffel als auch in den Zwiebelepidermiszellen in den Plastiden (Abb. 35, 36). Die Fluoreszenz des AtWhy1-GFP-Proteins, das in Fusion ein Molekulargewicht von 55 kD besitzt, ist dabei in kleinen Aggregaten innerhalb der Chloroplasten der Kartoffelprotoplasten zu erkennen. Die Fluoreszenz des AtWhy3-GFP hingegen scheint in den Chloroplasten homogener verteilt zu sein. In den fluoreszierenden Plastiden der Zwiebelepidermiszellen sind bei beiden Fusionsproteinen die Fluoreszenzen deutlich innerhalb der Plastiden zu erkennen. Sogar die so genannten 'Stromules' der Plastiden sind durch die GFP-Fluoreszenz sichtbar (Abb. 36).

Für das Fusionsprotein AtWhy2-GFP konnte in beiden Transformationsansätzen eine mitochondriale Lokalisation gezeigt werden. Als Kontrolle für die Lokalisation in den Mitochondrien wurde ein bereits beschriebenes *CoxIV-gfp*-Konstrukt verwendet (Akashi *et al.* 1998), das in den Kartoffelprotoplasten ein vergleichbares Fluoreszenzmuster wie das AtWhy2-GFP aufweist (Abb. 35). Um zu zeigen, dass es sich bei den fluoreszierenden Organellen tatsächlich um Mitochondrien handelt, wurde eine Vitalfärbung der transformierten Protoplasten mit 'Mitotracker Orange' durchgeführt. In einem Überlagerungsbild der GFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz des 'Mitotracker Orange' wird deutlich, dass es sich um Mitochondrien handelt (Abb. 37). In keinem dieser Transformationsansätze konnte eine Lokalisation im Zellkern beobachtet werden.

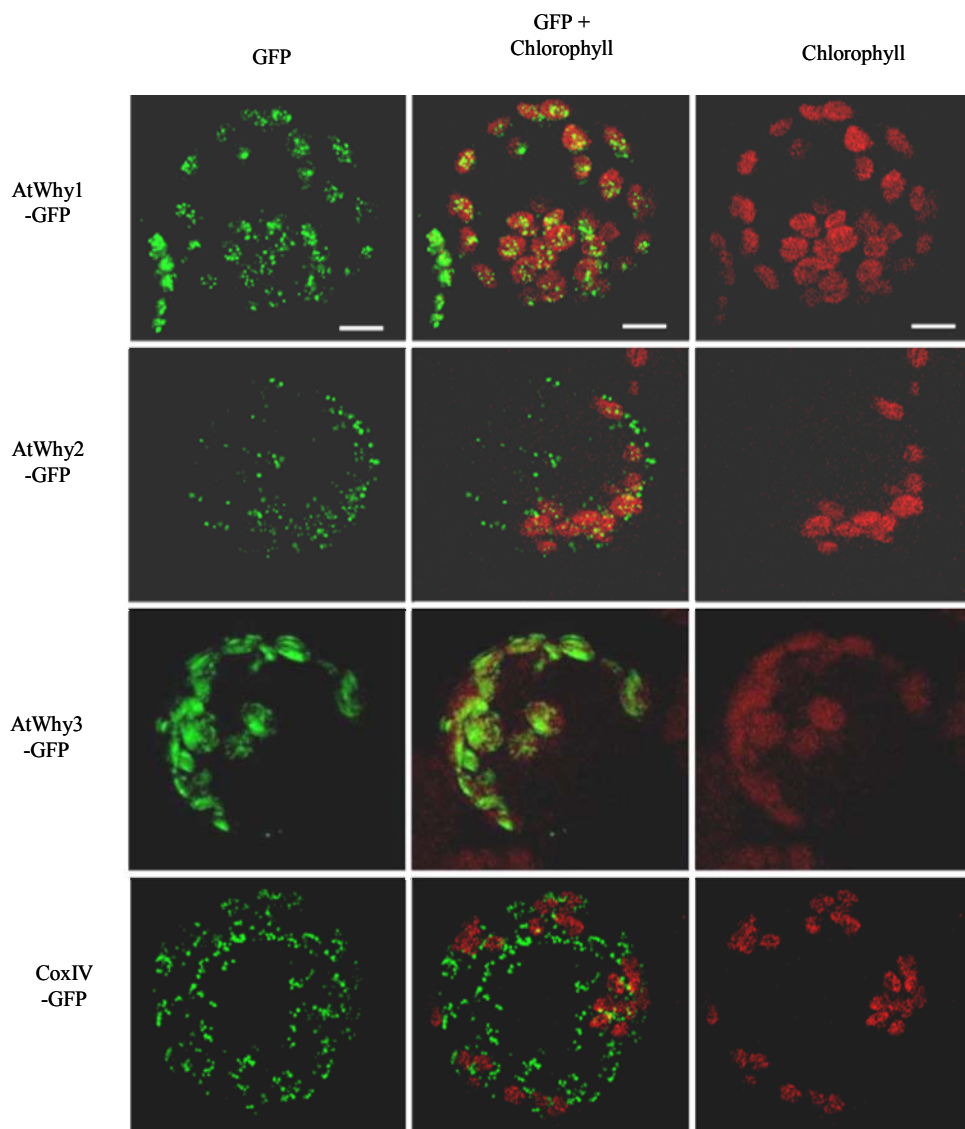


Abb. 35 Subzelluläre Lokalisation der Proteine AtWhy1, 2 und 3 in Fusion mit GFP nach Transformation von Kartoffelprotoplasten. Abgebildet sind die Einzelbilder der GFP- (links) und der Chlorophyll-Fluoreszenz (rechts), sowie das Überlagerungsbild beider Fluoreszenzen (mittig). Als Kontrolle für die mitochondriale Lokalisation wurde ein *CoxIV-gfp*-Konstrukt (Akashi *et al.* 1998) verwendet. Die Analyse erfolgte 24 h nach der Transformation unter Einsatz eines CLSM (Leica). Der angegebene Maßstab entspricht 8 μm .

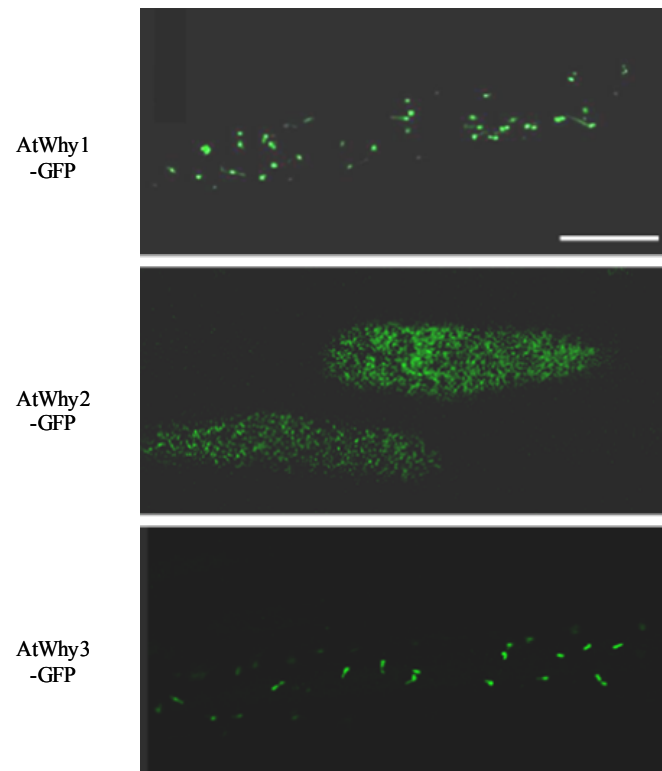


Abb. 36 Subzelluläre Lokalisation von AtWhy1-, AtWhy2- und AtWhy3-GFP-Fusionsproteinen nach biolistischer Transformation von Zwiebelepidermiszellen. Die Analyse erfolgte 24 h nach der Transformation unter Einsatz eines CLSM. Der angegebene Maßstab entspricht 80 µm.

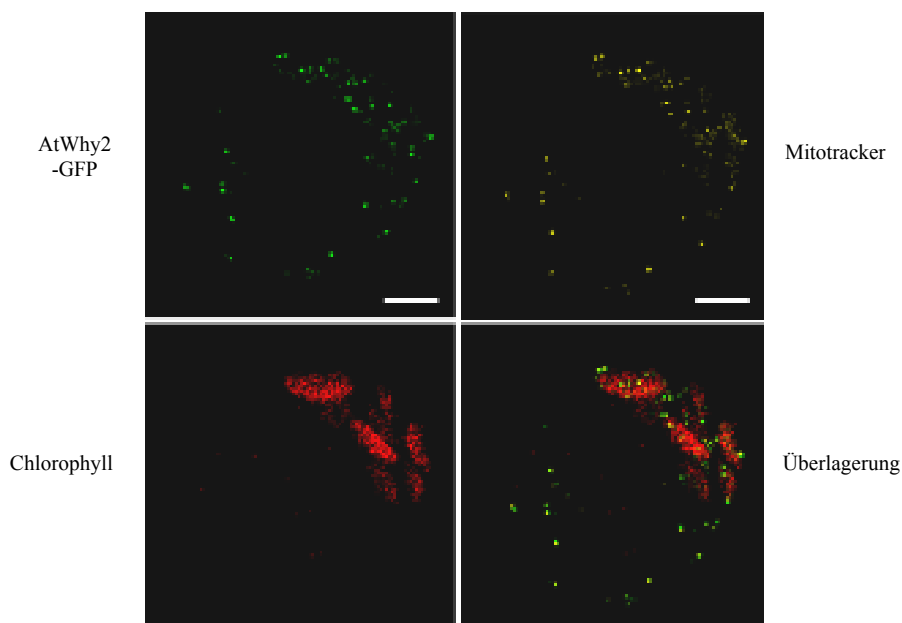


Abb. 37 Subzelluläre Lokalisation des AtWhy2-GFP-Fusionsproteins in Mitochondrien. Die Kartoffelprotoplasten wurden 24 h nach der AtWhy2-GFP Transformation in einer Mitotracker-Färbelösung inkubiert. Die Analyse erfolgte unter Einsatz eines CLSM. Der angegebene Maßstab entspricht 8 µm.

3.7.2 Lokalisation der Whirly1-Proteine nach Entfernung der plastidären Importsequenz

Die plastidäre Importsequenz (PTP, ‚plastid target peptide‘) des AtWhy1 scheint für die Lokalisation des Proteins in den Plastiden verantwortlich zu sein. Um dies zu überprüfen und um die Möglichkeit zu untersuchen, ob das Protein ohne diese Importsequenz im Zellkern akkumuliert, wurde die zugehörige cDNA ohne Importsequenz (Δ PTP-AtWhy1) in Fusion mit *gfp* unter Kontrolle des 35S CaMV-Promotors gebracht und über transiente Transformation in Zwiebelepidermiszellen exprimiert (Abb. 38). Als weiteres Protein wurde das HvWhy1 aus Gerste analysiert. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit dem AtWhy1-Protein legt die Vermutung nahe, dass dem HvWhy1-Protein N-terminal die Importsequenz fehlt (Abb. 34). Daher wird das HvWhy1-Protein im Rahmen dieser Arbeit auch als Δ PTP-HvWhy1-Protein bezeichnet. Eine theoretisch ermittelte Lokalisation der Proteine ergab, dass bei fehlender Importsequenz für das AtWhy1-Protein keine Lokalisation mehr in den Plastiden vorhergesagt wurde, sondern eine Lokalisation in anderen intrazellulären Räumen (s. 3.7, Tab. 9), die über das Programm ‚TargetP‘ nicht genauer definiert werden.

Für die transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen wurde zusätzlich zu den Δ PTP-AtWhy1- und Δ PTP-HvWhy1-*gfp*-Konstrukten auch ein Konstrukt verwendet, das nur für das GFP-Protein allein kodiert. Aufgrund seines geringen Molekulargewichts von 26 kD kann das GFP-Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern akkumulieren (Grebek et al. 1997). Die mit beiden Konstrukten transformierten Zwiebelepidermiszellen fluoreszieren ebenfalls sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern (Abb. 38). Es ist keine Lokalisation in den Plastiden, wie für das AtWhy1-GFP gezeigt (Abb. 35, 36), zu erkennen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation im Zellkern sowohl des AtWhy1-Proteins als auch des HvWhy1-Proteins möglich ist, sofern die Importsequenz fehlt. In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass das überexprimierte HvWhy1-Protein an die Motive 1 und 2 des HvS40-Promotorbereichs sowie an Telomersequenzen binden kann. Andererseits deuten die Experimente zur Lokalisation der Whirly-Proteine aus *A. thaliana* auf eine Akkumulation in den Organellen hin. Dieses wirft Fragen zur generellen Bedeutung der Whirly-Proteine auf, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter bearbeitet wurden.

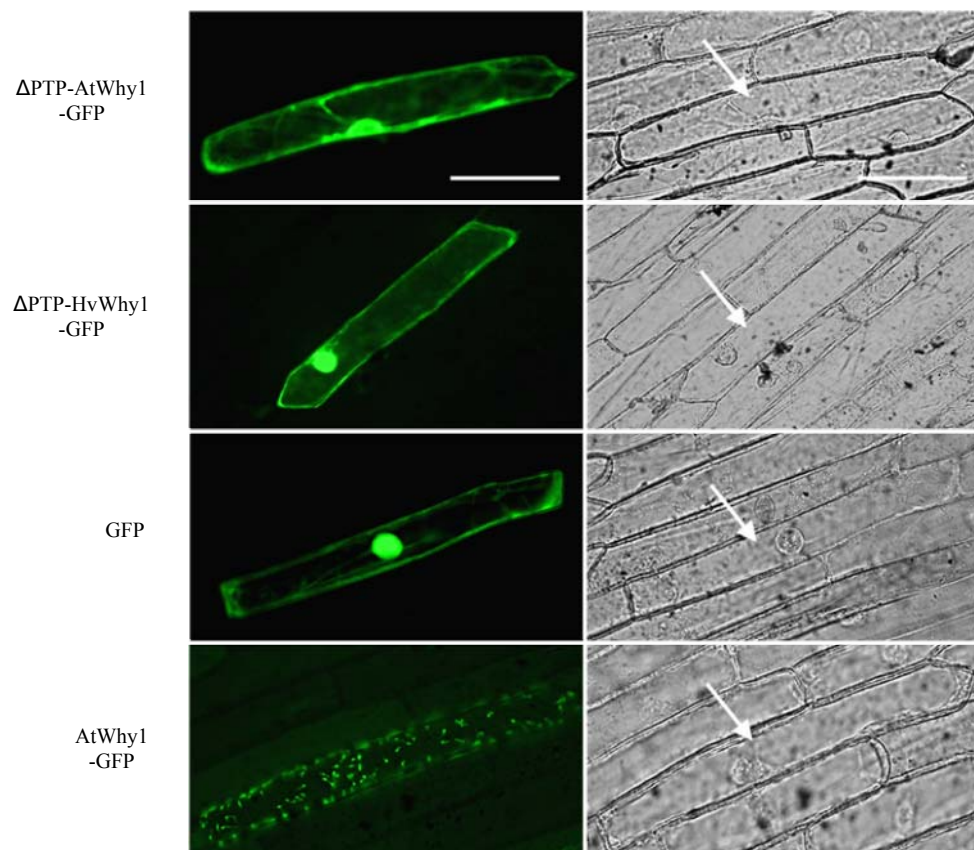


Abb. 38 Subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine AtWhy1 und HvWhy1 ohne Importsequenz (Δ PTP). Als Referenzen sind die Lokalisationen des GFP-Proteins und des AtWhy1-GFP-Fusionsproteins nach biolistischer Transformation von Zwiebelepidermiszellen abgebildet. Dargestellt sind die Einzelbilder der GFP-Fluoreszenz und der Hellfeldaufnahmen. Die Pfeile weisen auf die transformierten Zellen hin. Die Analyse erfolgte 24 h nach der Transformation unter Einsatz des Axiophots (Zeiss). Der angegebene Maßstab entspricht 100 μ m.

4 Diskussion

4.1 Funktion des HvS40-Proteins

Das HvS40-Protein ist ein kleines Protein, dessen Funktion unbekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Phosphorylierbarkeit des Proteins durchgeführt. Zur funktionellen Analyse des Proteins wurde das *HvS40*-Gen sowohl in Gerste als auch in *A. thaliana* überexprimiert. Im Folgenden sollen die Eigenschaften des Proteins im Hinblick auf mögliche Funktionen in der Gerste diskutiert werden.

4.1.1 Charakterisierung des HvS40-Proteins

Das HvS40-Protein ist aufgrund seines geringen Molekulargewichts von 15,4 kD in der Lage, passiv vom Cytoplasma in den Zellkern zu gelangen. Dennoch besitzt das Protein zwei Kernlokalisationssignale (NLS), die eine regulierte Akkumulation im Zellkern fördern. Durch Fusionsproteine mit GUS und GFP konnte eine deutliche Lokalisation im Zellkern gezeigt werden (s. 3.1.2, 3.4.4), so dass hier von einer aktiven Translokation in den Zellkern ausgegangen werden kann. Nach Fusion mit GUS wurde aber auch eine geringe Menge des HvS40-Proteins im Cytoplasma nachgewiesen (Krupinska *et al.* 2002). Für einen Export aus dem Zellkern spricht eine in der HvS40-Sequenz vorhandene Kernexportsequenz (NES), die für ‚Shuttle‘-Proteine typisch ist. Eine Wanderung zwischen Cytoplasma und Zellkern ist charakteristisch für regulatorische Proteine. Der Import in den Zellkern bzw. der Export aus dem Zellkern ist abhängig von posttranslationalen Modifikationen, der Konformation des Proteins, sowie einer möglichen Retention durch gebundene Interaktionspartner (Merkle 2001). Posttranslationale Modifikationen können durch äußere Faktoren, wie z.B. biotischen und abiotischen Stress ausgelöst werden (Dong 2004, Silva-Filho 2003, Spoel *et al.* 2003). So wurde für eine MAPK gezeigt, dass das Protein bei Pathogenbefall phosphoryliert und sofort in den Zellkern transportiert wird (Ligterink *et al.* 1997). Aus tierischen Systemen ist ein Transkriptionsfaktor bekannt, dessen Lokalisation zwischen Cytoplasma und Zellkern ebenfalls über Phosphorylierung oder Bindung von Proteinen reguliert wird und der eine Rolle bei Apoptose und zellulärer Seneszenz spielen kann (Kurooka und Yoshifumi 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Phosphorylierung des überexprimierten HvS40-Proteins gezeigt werden (s. 3.1.3). Es wäre denkbar, dass das Protein in dephosphorylierter Form im Cytoplasma vorliegt und erst durch eine Phosphorylierung in den Zellkern wandern kann.

Ein weiterer Faktor, der die Halbwertszeit eines Proteins in einem spezifischen Kompartiment beeinflussen kann, ist der Proteinabbau. Im tierischen System wurde gezeigt, dass über den Proteinabbau die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann. So wurde für den Transkriptionsfaktor NF κ B nachgewiesen, dass er im Cytoplasma an einen Inhibitor gebunden vorliegt. Durch einen Stimulus wird der Inhibitor phosphoryliert und NF κ B wird frei. NF κ B kann nun in den Zellkern wandern und dort die Expression von Genen regulieren, während der Inhibitor nach der Phosphorylierung abgebaut wird (Chen *et al.* 1995). Wie andere Proteine, die reguliert abgebaut werden und eine geringe Halbwertszeit haben, besitzt das HvS40-Protein eine PEST-Sequenz. Dies ist eine Signalsequenz für den proteolytischen Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (Chen und Clarke 2002). Der Transkriptionsfaktor pBrp („plant-specific TFIIB-related protein“) aus *A. thaliana* besitzt eine PEST-Sequenz und hat eine geringe Halbwertszeit (Lagrange *et al.* 2003). pBrp ist an der cytoplasmatischen Seite der äußeren Plastidenmembran gebunden. Es wird angenommen, dass ein Signal aus den Plastiden eine posttranslationale Modifikation des Proteins verursacht, das dann in den Zellkern transportiert wird. Im Zellkern interagiert das pBrp-Protein mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und kann somit die Genexpression beeinflussen. Eine unkontrollierte Akkumulation des Transkriptionsfaktors wird vermutlich durch einen schnellen Abbau des Proteins über das Proteasom vermieden (Lagrange *et al.* 2003). Ein weiteres Protein, das vom Cytoplasma in den Zellkern wandern kann, ist das NPR1-Protein aus *A. thaliana*. NPR1 ist als Regulator an der PR-Genexpression beteiligt (Dong 2004). Ein NPR1-GFP-Fusionsprotein, das in Pflanzen überexprimiert wird, ist sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Kinkema *et al.* 2000). Erst durch die Zugabe von Salicylsäure, wodurch die systemisch erworbene Resistenz ausgelöst wird, akkumuliert das NPR1-Protein ausschließlich im Zellkern. Eine ähnliche Regulation der Lokalisation wäre auch für das HvS40-Protein denkbar. Durch *In-situ*-Hybridisierungen an Schnitten von Primärblättern der Gerste, in denen durch Dunkelinkubation die Seneszenz ausgelöst wurde, konnte eine Akkumulation des HvS40-Transkripts um die Plastiden herum nachgewiesen werden (Krupinska *et al.* 2002). Es ist möglich, dass das Protein auch dort synthetisiert wird. Bisher wurde die Lokalisation des HvS40-Proteins nur in transienten Transformationsansätzen untersucht. Diese Methode ist stets mit einer Verwundung verbunden, die z.B. mit der Bildung von Jasmonat einhergeht. Dies könnte eine Signalsubstanz sein, die zu einer Wanderung des HvS40-Proteins vom Cytoplasma in den Zellkern führt.

Die Expression des HvS40-Gens wird durch verschiedenste Stressoren wie Pathogenbefall, Verwundung oder der Seneszenz gefördert. Ausgehend von einer anschließenden Synthese des Proteins wäre folgendes Modell zur Regulation der Lokalisation des Proteins denkbar. Das HvS40-Protein liegt zunächst im Cytoplasma vor. Während der Seneszenz kommt es durch einen Stimulus zur Phosphorylierung und damit zum Wandern des Proteins vom Cytoplasma in den Zellkern. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Motive in der Sequenz des HvS40-Proteins (s. 3.1.1) wäre eine Funktion des Proteins als Regulator denkbar. Obwohl das

HvS40-Protein nicht über eine bekannte DNA-Bindedomäne verfügt, wurde dem Protein aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften eine Funktion als DNA-Bindeprotein zugeschrieben (Han *et al.* 2005). Bisher gibt es jedoch keine experimentellen Hinweise auf eine Bindung des Proteins an DNA. Das HvS40-Protein könnte als DNA-Bindeprotein die Genexpression von *PR*-Genen oder SAGs fördern. Andererseits ist es auch möglich, dass das Protein als Interaktionspartner die Wanderung von Regulatoren aus dem Cytoplasma in den Zellkern beschleunigt und damit indirekt die Genexpression beeinflusst. Über den schnellen Abbau des HvS40-Proteins könnte eine kontrollierte Expression der *PR*-Gene oder SAGs stattfinden. In Abbildung 39 ist ein Modell dargestellt, das die mögliche Funktion des HvS40-Proteins als ‚Shuttle-Protein‘ und eine mögliche Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor veranschaulicht.

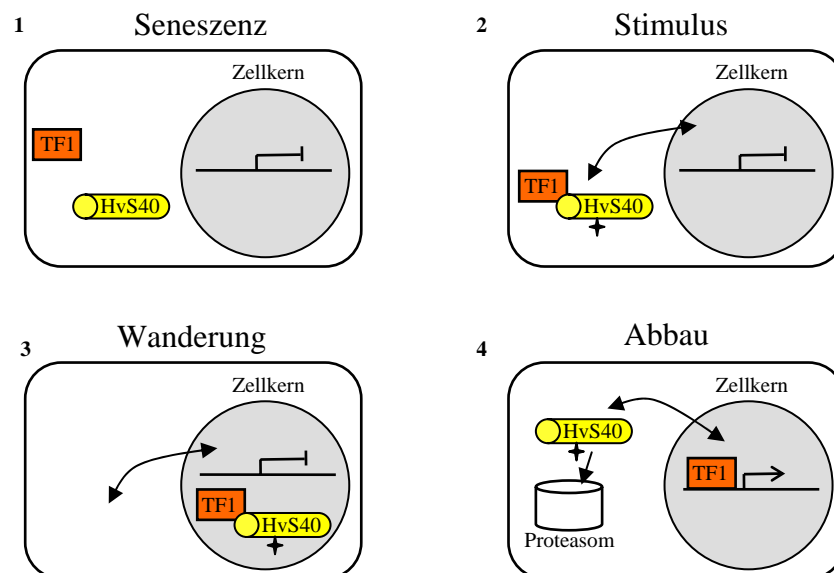


Abb. 39 Modell zur möglichen ‚Shuttle‘-Funktion des HvS40-Proteins. 1 Das HvS40-Protein liegt inaktiv im Cytoplasma vor. 2 Durch einen Stimulus wird es phosphoryliert (Stern) und kann dabei mit Transkriptionsfaktoren (TF) interagieren. 3 Es wandert vom Cytoplasma in den Zellkern und kann somit den Interaktionspartner von einem Kompartiment zum anderen transportieren. 4 Das HvS40-Protein wird in phosphorylierter Form durch das Proteasom-System abgebaut.

Für die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte Hypothese zur regulatorischen ‚Shuttle‘-Funktion des HvS40-Proteins gibt es bisher keine experimentellen Beweise. In künftigen Arbeiten wäre zunächst zu klären, ob das Protein über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Zur Prüfung der funktionellen Bedeutung der potentiellen NES- oder PEST-Sequenzen wäre eine gerichtete Mutagenese der Bereiche geeignet. Des Weiteren ist zu untersuchen, wie das Protein *in-vivo* in der Zelle verteilt ist und ob sich die Verteilung durch biotischen oder abiotischen Stress verändert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten transgene Pflanzen erstellt werden, die das *HvS40*-Gen überexprimieren und die gegebenenfalls zur Untersuchung dieser Fragestellung geeignet sind.

4.1.2 Überexpression des *HvS40*-Gens in Gerste und *A. thaliana*

Zur funktionellen Analyse des HvS40-Proteins wurden in dieser Arbeit Ansätze zur Transformation von Gerste und *A. thaliana* durchgeführt. Am Institut für Pflanzenzüchtung und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben wurde die konstitutive Überexpression des *HvS40*-Gens in Gerste erfolgreich durchgeführt. Von insgesamt 11 resistenten Pflanzen wurden vier Linien erhalten, in denen das *HvS40*-Gen konstitutiv exprimiert wird (s. 3.2). Aus der Transformation zur konstitutiven Überexpression in *A. thaliana* gingen vier Linien hervor, in denen das *HvS40*-Transkript bereits in jungem Gewebe nachweisbar war. Davon zeigte die *p35S::HvS40-HA/2*-Linie eine starke Akkumulation des Transkripts. Unter den sieben Linien von *A. thaliana*, die aus der Transformation mit dem seneszenzassoziierten *SAG13*-Promotors hervorgingen, konnte eine *pSAG13::HvS40-HA/6*-Linie identifiziert werden, die seneszenzspezifisch eine starke Akkumulation des *HvS40*-Transkripts zeigt (s. 3.3). Das *SAG13*-Gen, das für eine Alkohol-Dehydrogenase kodiert, wird während der Seneszenz schon deutlich vor Vergilbung der Blätter exprimiert und kann auch durch Stress induziert werden (Gan 1995, Weaver *et al.* 1998).

In den transgenen Pflanzen, die das *HvS40*-Gen konstitutiv exprimieren, ist grundsätzlich ein erhöhter Gehalt an HvS40-Protein zu erwarten. Bisher ist es in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Karin Krupinska nicht gelungen, das Protein in Gesamtproteinextrakten oder in Kernproteinen seneszenten oder hormonbehandelter Blattproben der Wildtyp-Gerste mit Hilfe eines HvS40-spezifischen Antikörpers nachzuweisen. In den überexprimierenden Pflanzen von *A. thaliana* konnte ein spezifisch gegen den HA-Tag gerichteter Antikörper verwendet werden, da das HvS40-Protein in Fusion mit einem HA-Tag vorliegen sollte (s. 3.3). Zum immunologischen Nachweis des Proteins wurden Gesamtproteine und Kernproteine aus Blättern der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie von *A. thaliana* untersucht. Unter der Annahme, dass das HvS40-Protein schnell über das Proteasom-System abgebaut wird (s. 3.1.1, 4.1.1), wurde während der Proteinextraktion der Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet. Es war im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich, das HvS40-Protein in Gesamtproteinextrakten und in Kernproteinen der transgenen Linie aus *A. thaliana* nachzuweisen. Da trotz Verwendung eines Proteasom-Inhibitors kein Nachweis des Proteins möglich war, konnte nicht geklärt werden, ob das Protein über das Proteasom-System abgebaut wird.

Es ist möglich, dass in den Pflanzen der *p35S::HvS40-HA/2*-Linie von *A. thaliana* und in den Überexpressionslinien der Gerste die Akkumulation des HvS40-Proteins durch schnellen Abbau vermieden wird. Unter dieser Annahme ist ein erhöhter Gehalt an HvS40-Protein in den Pflanzen eher unwahrscheinlich. Für künftige Arbeiten zur Untersuchung der Funktion des Proteins wäre die Herstellung und Analyse von RNAi-Pflanzen der Gerste sinnvoll. In diesen Pflanzen ist durch die postranskriptionelle Repression des *HvS40*-Transkriptes eine reduzierte Menge an HvS40-Protein zu erwarten. Diese Pflanzen sind gegebenenfalls besser geeignet, um die Funktion des HvS40-Proteins während der Seneszenz zu untersuchen. Es wäre aber auch möglich, dass das

HvS40-Protein unter bestimmten Bedingungen oder in bestimmten Geweben akkumuliert. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wären auch die Pflanzen der *pSAG13::HvS40-HA/6*-Linie, in denen das *HvS40*-Transkript seneszenzassoziiert und unter verschiedenen Stressbedingungen exprimiert wird, gut geeignet.

4.2 *HvS40* verwandte Gene in *A. thaliana*

Das HvS40-Protein gehört zu der pflanzenspezifischen DUF584-Familie, die durch eine konservierte Domäne im C-terminalen Bereich charakterisiert ist (s. 3.1.4). Alle Mitglieder dieser Familie haben bisher unbekannte Funktionen. *A. thaliana* besitzt in dieser Familie 15 Gene, deren zugehörige Proteine eine Verwandtschaft zum HvS40-Protein der Gerste aufweisen. *A. thaliana* eignet sich aufgrund der umfassenden Mutanten-Banken gut für funktionelle Analysen. Ein Ziel dieser Arbeit war, ein Gen aus der DUF584-Familie in *A. thaliana* zu identifizieren, das in seiner Expression und im Hinblick auf die zelluläre Lokalisation des zugehörigen Proteins dem *HvS40*-Gen der Gerste gleicht. Entsprechende Mutanten sollten dann für Untersuchungen zur Funktion des Gens herangezogen werden.

4.2.1 Expression *HvS40* verwandter Gene

Die Expression der DUF584-Gene in *A. thaliana* wurde im Hinblick auf Seneszenz, Einfluss von Phytohormonen und Pathogenbefall untersucht. Die Untersuchung zur Expression der Gene während der natürlichen Seneszenz zeigte, dass sieben Gene eine deutlich erhöhte Transkriptmenge in seneszierenden Blättern haben. Von diesen Genen konnten vier identifiziert werden, deren Transkripte auch während der dunkelinduzierten Seneszenz akkumulieren. Diese wurden als *AtS40-1*, *AtS40-2*, *AtS40-3* und *AtS40-4* bezeichnet. Die ersten drei Gene sind auf Proteinebene am engsten mit der HvS40-Sequenz verwandt und zählen zur Gruppe I der DUF584-Familie (s. 3.1.4). Die Behandlung 4 - 6 Wochen alter Pflanzen mit Abscisinsäure stimulierte bei drei Genen die Expression, während Methyljasmonat keine Wirkung auf die Expression der untersuchten Gene hat. Salicylsäure stimulierte nur die Expression der drei Gene *AtS40-2*, *AtS40-3* und *AtS40-4*. Um zu analysieren, ob die Gene eine Rolle während der Pathogenabwehr spielen könnten, wurden der bakterielle Erreger *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und der pilzliche Erreger *Botrytis cinerea* verwendet. Während die Expression der Gene durch eine Infektion mit *Botrytis cinerea* unbeeinflusst war, führte die Infektion mit dem bakteriellen Erreger bei allen vier untersuchten Genen zu einer Akkumulation von Transkripten. Aus den Untersuchungen zur Expression der DUF584-Gene von *A. thaliana* konnten 3 Gene (*AtS40-2*, *AtS40-3*, *AtS40-4*) identifiziert werden, die eventuell funktionell mit dem *HvS40*-Gen der Gerste vergleichbar sind.

Die drei Gene der DUF584-Gruppe von *A. thaliana* scheinen wie das *HvS40*-Gen der Gerste in ihrer Expression durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst zu werden, die im Zusammenhang mit Seneszenz und Pathogenabwehr stehen. Wie schon eingangs erläutert, ist die Pathogenabwehr ein aktiver Prozess, der durch ein spezifisches Programm angeschaltet und durch Verletzung von Zellen ausgelöst wird (Greenberg 1997). In gleicher Weise ist die Seneszenz ein aktiver Vorgang, der zu strukturellen Veränderungen in der Zelle führt (Nam 1997, Weaver *et al.* 1998). Die Zerstörung der Zellstruktur korreliert mit der Entstehung von oxidativem Stress, der ein Teil der allgemeinen Stressantwort der Pflanze auf biotische und abiotische Einflüsse ist. Es wäre denkbar, dass der oxidative Stress zu einer Aktivierung der hier untersuchten Gene führt. Diese könnten am Schutz des Gewebes vor oxidativer Zerstörung beteiligt sein und damit eine effektive Mobilisierung von Nährstoffen gewährleisten.

Die durch Zugabe von Salicylsäure induzierte Expressionssteigerung der hier untersuchten DUF584-Gene von *A. thaliana* könnte im Zusammenhang mit der systemisch erworbenen Resistenz stehen. Die Signaltransduktion über Salicylsäure spielt hauptsächlich eine Rolle bei der Abwehr von biotrophen Pathogenen und bei der Induktion der systemisch erworbenen Resistenz gegenüber mikrobiellen Erregern. Der Pilz *Erysiphe graminis* sowie der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae*, die die Expression des *HvS40*-Gens und die der drei untersuchten *AtS40*-Gene positiv beeinflussen, sind biotrophe Erreger, die sich von den Nährstoffen des infizierten Gewebes ernähren, ohne das Wirtsgewebe abzutöten (Govrin und Levine 2002). Die Pflanze kann durch eine hypersensitive Reaktion, die die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und lokalem Zelltod beinhaltet, die Ausbreitung des Pathogens verhindern (Greenberg 1997, Hückelhoven *et al.* 2000). Diese Abwehrreaktion führt in der Pflanze zu einer Expression von Abwehrgenen. Mittlerweile sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aus der NAC- und WRKY-Familie bekannt, die als positive oder negative Regulatoren eine Rolle bei der Antwort auf Salicylsäure als auch auf biotrophe Pathogene spielen (Li *et al.* 2004, Jensen *et al.* 2007, Zheng *et al.* 2007). Auch die hier untersuchten Gene könnten am Aufbau der systemisch erworbenen Resistenz der Pflanze beteiligt sein.

Ein weiterer Signalweg, der in der Pflanze zu einer Abwehrreaktion bei Pathogenbefall führt, ist der über Jasmonat und Ethylen vermittelte Weg. Dieser Signalweg ist vor allem bei der Abwehr von Herbivoren und nekrotrophen Pathogenen wichtig (Glazebrook 2005). Nekrotrophe Pathogene verursachen durch die Sekretion von Toxinen den Tod der Wirtszellen, um an die Nährstoffe zu gelangen (Govrin und Levine 2002). Um dies zu vermeiden, reagiert z.B. die Gerstenpflanze auf eine Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Pyrenophora teres* lokal mit einer hypersensitiven Reaktion (Krupinska *et al.* 2002). Die Expression des *HvS40*-Gens wird lokal durch eine Infektion mit *Pyrenophora teres* und auch nach einer Behandlung mit Methyljasmonat hochreguliert. Dagegen haben der nekrotrophe Pilz *Botrytis cinerea* und Methyljasmonat keinen Einfluss auf die Expression der *HvS40*-ähnlichen Gene aus *A. thaliana*. Der unterschiedliche Einfluss von Methyljasmonat auf die Expression des *HvS40*-Gens und der hier ausgewählten

Gene von *A. thaliana* könnte auf die unterschiedliche Applikation des Phytohormons zurückzuführen sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Behandlung mit Methyljasmonat ohne Verwundung der Blätter von *A. thaliana* durchgeführt, während die Inkubation der Gerstenblätter mit einer gleichzeitigen Verwundung des Blattgewebes verbunden war (Krupinska *et al.* 2002). Durch die Verwundung wird in der Pflanze Ethylen produziert (Léon *et al.* 2001), das zusammen mit Jasmonat zu einer Expression des *HvS40*-Gens in Gerste geführt haben kann. Die unveränderte Expression der Gene nach Infektion mit dem Pilz *Botrytis cinerea* steht im Widerspruch zu den *in-silico*-Daten, die insbesondere für das *AtS40-3*-Gen eine starke Akkumulation des Transkripts erwarten ließen.

Ob die hier in *A. thaliana* identifizierten Gene tatsächlich eine vergleichbare Funktion wie das *HvS40*-Gen besitzen, bleibt zu klären. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Signalwege, die in Zusammenhang mit Stress stehen, die Expression der hier untersuchten *S40*-Gene beeinflussen können und diese damit anscheinend eine Rolle bei der Antwort der Pflanze auf biotischen und abiotischen Stress spielen.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation HvS40 verwandter Proteine

Das *HvS40*-Protein in Fusion mit GUS oder GFP akkumuliert unter transienten Bedingungen hauptsächlich im Zellkern. Das Protein verfügt über zwei Kernlokalisierungssignale und über eine potentielle Kernexportsequenz, die eine Wanderung des Proteins zwischen Zellkern und Cytoplasma möglich machen könnte (s. 4.1.1).

Die Expressionsanalysen der DUF584-Gene aus *A. thaliana* ergab, dass es drei Gene gibt, die eine ähnliche Expression wie das *HvS40*-Gen der Gerste zeigen (s. 3.4). Um einen weiteren Hinweis zu erlangen, ob ihre zugehörigen Proteine funktionell die gleiche Rolle spielen könnten, wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine in transienten Ansätzen mit Hilfe von GUS-Fusionsproteinen untersucht. Dabei konnte nur für das Fusionsprotein *AtS40-3*-GUS sowohl eine Anreicherung im Zellkern als auch eine Lokalisation im Cytoplasma ermittelt werden (s. 3.4.4). Die Fusionsproteine *AtS40-2*-GUS und *AtS40-4*-GUS waren dagegen nur im Cytoplasma nachweisbar. Die Aminosäuresequenz des *AtS40-3*-Proteins besitzt kein bekanntes Kernlokalisierungssignal oder Kernexportsignal. Proteine, die kleiner als 60 kD sind, können durch Diffusion in den Zellkern gelangen (Köhler 1998). Dies wäre für das *AtS40-3*-Protein, das ein Molekulargewicht von 12,5 kD besitzt, grundsätzlich möglich. In Fusion mit GUS, das ein Molekulargewicht von 68 kD besitzt, ist eine passive Diffusion in den Zellkern jedoch unwahrscheinlich. Dies bedeutet, dass das Protein aktiv in den Zellkern gelangen muss. Einerseits könnte ein noch unbekanntes Kernlokalisierungssignal dafür verantwortlich sein, andererseits könnte das Protein gebunden an ein anderes Protein in den Zellkern transportiert werden. Dies wurde bereits für eine MAPK beschrieben, die ohne ein Kernlokalisierungssignal in den Zellkern transportiert wird, indem das

Protein einen Komplex mit anderen Proteinen bildet, die den Import in den Zellkern gewährleisten (Ligterink *et al.* 1997).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des AtS40-3-Proteins mit der des HvS40-Proteins zeigt, dass beide Proteine hypothetische Phosphorylierungsstellen und eine PEST-Sequenz besitzen, die für die Regulation und die subzelluläre Lokalisation eine Rolle spielen könnten (s. 4.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das überexprimierte HvS40-Protein phosphoryliert werden kann (s. 3.1.3). Um weitere Hinweise auf eine vergleichbare Funktion des AtS40-3-Proteins zu erhalten, ist zu klären, ob auch das AtS40-3-Protein phosphorylierbar ist. Bei näherer Betrachtung der Phosphorylierungsstellen scheint es eine konservierte Phosphorylierungsstelle in der DUF584-Domäne zu geben, die in beiden Proteinen vorkommt. Durch gezielte Mutagenese dieser Aminosäure könnte geprüft werden, ob diese Phosphorylierungsstelle für die Lokalisation in der Zelle von Bedeutung ist.

Die Proteine AtS40-2 und AtS40-4, die unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen keine Lokalisation im Zellkern zeigten, dürfen jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Auch diese Proteine verfügen über die konservierte potentielle Phosphorylierungsstelle, was für eine generelle Phosphorylierung der DUF584-Proteine spricht. Das AtS40-4-Protein besitzt ebenso wie die Proteine AtS40-3 und HvS40 eine potentielle PEST-Sequenz. Es kann hier also nicht ausgeschlossen werden, dass die drei Proteine aus *A. thaliana* eine redundante Funktion besitzen. Dies kommt in *A. thaliana* häufig vor, denn die Duplikationsrate von Genen ist sehr hoch (Vision *et al.* 2000, Simillion *et al.* 2002).

4.2.3 Analyse der T-DNA-Insertionslinien des *AtS40-3*-Gens

Zur Untersuchung der Funktion des *AtS40-3*-Gens während der Seneszenz von *A. thaliana* wurden zwei T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp von *A. thaliana* über 11 Wochen charakterisiert. Beide Linien zeigten im Vergleich zum Wildtyp bis zur achten Woche eine leicht verzögerte Seneszenz. Nach der neunten Woche scheint diese Verzögerung in der Δ_2 AtS40-3-Linie aufgehoben zu sein, während die Δ_1 AtS40-3-Linie bis zur zehnten Woche immer noch grüner erscheint als der Wildtyp. Die Verzögerung der Seneszenz in der Δ_1 AtS40-3-Linie konnte auch dadurch gezeigt werden, dass das *SAG12*-Transkript verzögert akkumuliert (s. 3.5). Die T-DNA-Insertion liegt in der Δ_2 AtS40-3-Linie im Promotor weiter stromaufwärts des Startkodons als in der Δ_1 AtS40-3-Linie (s. 3.5). Der Promotorbereich in dieser Δ_2 AtS40-3-Linie, der stromabwärts der T-DNA-Insertion liegt, beinhaltet zwei W-Boxen, zwei ABRE-Motive und eine E-Box, die für eine Expression während der Seneszenz sorgen könnten. Allerdings konnte für beide Linien nachgewiesen werden, dass das *AtS40-3*-Transkript seneszenzabhängig akkumuliert. Ob die Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp verändert ist, konnte mittels der hier angewandten semiquantitativen RT-PCR nicht ermittelt werden. Zur Klärung dieser Fragestellung könnte die

Analyse der Transkriptmengen in den T-DNA-Insertionslinien über ‚Real-Time-PCR‘ Aufschluss geben. Es wäre auch denkbar, dass die T-DNA-Insertion zu einer Störung der Expression unter Stressbedingungen führt. Dies könnte durch die Analyse der Linien unter den verschiedensten Bedingungen wie dem Einfluss von Phytohormonen und Pathogenen getestet werden. Da in einer der beiden Insertionslinien die Seneszenz verzögert war, kann angenommen werden, dass das AtS40-3-Protein als regulatorisches Protein die Seneszenz beeinflussen kann. Um dies zu bestätigen, sind in künftigen Arbeiten Linien zu untersuchen, die eine T-DNA-Insertion im kodierenden Bereich des Gens besitzen.

4.3 Regulation der Expression des *HvS40*-Gens

Die Expression des seneszenzassoziierten *HvS40*-Gens wurde bereits ausführlich untersucht (Haußühl 1998, Krupinska *et al.* 2002, Dähnhardt 2003). Über ‚run-on‘-Transkriptionsanalysen mit isolierten Kernen wurde gezeigt, dass das Gen auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Scharrenberg *et al.* 2003). Bisher ist jedoch wenig über die Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Gens beteiligt sein könnten, bekannt. Der Promotorbereich des *HvS40*-Gens weist eine Reihe von *cis*-Elementen auf, an die regulatorische Proteine binden könnten. Durch die Bindung an ein *HvS40*-Promotorelement konnte das Whirly1-Protein als möglicher Regulator identifiziert werden (Dähnhardt 2003). Im Folgenden soll die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der *cis*-Elemente des *HvS40*-Promotors mit den bisher bekannten Expressionsstudien in Zusammenhang gebracht werden. In einem weiteren Abschnitt wird auf die Untersuchungen zur Expression des *HvS40*-Gens unter einer möglichen Regulation des Whirly1-Proteins eingegangen.

4.3.1 Regulatorische *cis*-Elemente des *HvS40*-Promotors

Die W-Boxen, die im *HvS40*-Promotor vorhanden sind, sollen hier als regulatorische *cis*-Elemente von vorrangigem Interesse sein. W-Boxen sind häufig in Promotoren von Genen zu finden, die an der Pathogenabwehr, abiotischem Stress und der Seneszenz beteiligt sind (Ülker und Somssich 2004). Sie sind stark repräsentiert in Genen, die bei der systemisch erworbenen Resistenz eine Rolle spielen (Maleck *et al.* 2000), die von dem Phytohormon Salicylsäure abhängig ist. Die Expression des *PR1*-Gens, das bei der systemisch erworbenen Resistenz verstärkt aktiv ist, wird unter normalen Bedingungen durch WRKY-Transkriptionsfaktoren reprimiert, die sich bei Pathogenbefall vom Promotor ablösen und damit die Expression des Gens zulassen. Es gibt aber auch WRKY-Faktoren, die die Expression von Abwehrgenen fördern. So wurde z.B. in *A. thaliana* gezeigt, dass die Überexpression des *AtWRKY18*-Gens zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen führt (Chen und Chen 2002). Das Transkript des *HvS40*-Gens akku-

muliert sowohl nach exogener Applikation von Salicylsäure als auch nach Infektion mit dem Pilz *Pyrenophora teres* (Krupinska *et al.* 2002). Es ist also grundsätzlich möglich, dass Aktivatoren der WRKY-Familie an die im Promotor vorkommenden W-Boxen binden können und die Expression des Gens bei Pathogenbefall fördern. Der Promotor besitzt aber noch weitere Elemente, an die MYB- und MYC-Faktoren binden können, die an der Regulation von Genen bei der Pathogenabwehr beteiligt sind (Narusaka *et al.* 2004). Die TGTCA-Motive, die im *HvS40*-Promotor mit dem ‚inverted repeat‘ (IR2) des ERE-Elements überlappen, werden von ‚Homeo-domain‘-Transkriptionsfaktoren gebunden. Diese spielen wahrscheinlich bei der Regulation der Transkription von Abwehrgenen bei Pathogenbefall und bei programmiertem Zelltod eine wichtige Rolle (Korfhage *et al.* 1994, Mayda *et al.* 1999).

Das ERE-Element des *PR10a*-Gens der Kartoffel wurde ebenfalls im Zusammenhang mit Pathogenbefall identifiziert (Després *et al.* 1995). Die Motive 1 und 2 des *HvS40*-Promotors, die sowohl W-Boxen als auch TGTCA-Boxen enthalten, könnten sowohl während der Pathogenabwehr als auch bei Seneszenz von Bedeutung sein. An einer seneszenzspezifischen Regulation des *HvS40*-Gens könnten auch ABRE- und ACGT-Motive beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, dass diese Motive im Promotor des *erd1*-Gens (‚early responsive to dehydration‘) für eine verstärkte Expression in dunkelinkubierten Pflanzen und auch während der natürlichen Seneszenz sorgen (Nakashima *et al.* 1997, Simpson *et al.* 2003). Die ABRE- und ACGT-Elemente sind ebenfalls Bindemotive für Proteine, die in Gerste die Antwort auf Phytohormone wie Abscisinsäure, Jasmonat und Salicylsäure regulieren (Shen *et al.* 2004). Diese Motive, die auch Bestandteile des *HvS40*-Promotors sind, könnten die spezifische Expression des Gens unter Einfluss dieser Hormone unterstützen (Krupinska *et al.* 2002). ACGT-Motive sowie die (CA)_n-Elemente des *HvS40*-Promotors könnten die Expression des Gens während der Keimung regulieren (Kang und Singh 2000, Wu *et al.* 2000). Bei der Keimung des Samens spielt auch Abscisinsäure eine Rolle. So konnten für DPBF-Transkriptionsfaktoren, die bei der Keimung bedeutend sind, eine Akkumulation ihrer Transkripte unter Einfluss von Abscisinsäure ermittelt werden (Kim *et al.* 2002). Die erhöhte Aktivität des *HvS40*-Gens konnte bereits während der Samenkeimung und nach Inkubation von Primärblättern mit Abscisinsäure nachgewiesen werden (Dähnhardt 2003, Wedemeyer 2005).

4.3.2 Whirly1 als Transkriptionsfaktor des *HvS40*-Promotors

Das überexprimierte HvWhy1-Protein der Gerste, das im Rahmen dieser Arbeit ohne eine plastidäre Importsequenz vorlag, bindet mit hoher Affinität an die Einzelstränge des Motiv 1 und Motiv 2 des *HvS40*-Promotors. Das Motiv 2 beinhaltet eine W-Box und das ERE-ähnliche Element des *PR10a*-Promotors, das aus zwei ‚inverted repeats‘ (IR1, IR2) besteht (s. 1.4, 3.6.1). Das Motiv 1 dagegen enthält nur ein IR2-Motiv in Ergänzung zur W-Box. Es konnte gezeigt wer-

den, dass das HvWhy1-Protein ebenso wie das StWhy1-Protein der Kartoffel an ERE-ähnliche Elemente binden kann. Das StWhy1 bindet als Homotetramer an den Promotor des *PR10a*-Gens bei Pathogenbefall und löst als Aktivator die Expression des *PR*-Gens aus. Ein Teil des ERE-Elements wird auch als sogenanntes PB-Element (GTCAAAA/T) bezeichnet (Desveaux *et al.* 2004). Die Motive 1 und 2 des *HvS40*-Promotors besitzen jeweils ein IR2-Motiv (GTCAGAAA, GTCAAAT), das sich nur in einer Base von der Konsensus-Sequenz des PB-Elements unterscheidet (unterstrichen). Dieses Element existiert häufig in Promotoren von Genen, die früh nach Behandlung mit Salicylsäure eingeschaltet werden. Salicylsäure, die bei der systemisch erworbenen Resistenz eine Rolle spielt, induziert in *A. thaliana* die DNA-Bindeaktivität von AtWhy1 (Desveaux *et al.* 2004). Tilling'-Mutanten des *AtWhy1*-Gens zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit dem Pilz *Peronospora parasitica*. Da das *HvS40*-Gen sowohl nach Pathogenbefall als auch nach Behandlung mit Salicylsäure exprimiert wird, wäre es denkbar, dass das HvWhy1 an der Regulation der Genexpression unter diesen Bedingungen beteiligt ist. Es wird postuliert, dass das AtWhy1-Protein in der Regel im Zellkern an einen Inhibitor gebunden vorliegt. Es wird weiterhin angenommen, dass diese Bindung unter Einfluss von Salicylsäure aufgehoben wird und AtWhy1 die Expression von Salicylsäure induzierten Genen auslösen kann (Desveaux *et al.* 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit eine Akkumulation eines AtWhy1-GFP-Fusionsproteins in den Plastiden gezeigt werden konnte, wäre auch denkbar, dass die DNA-Bindung des Why1-Proteins im Zellkern durch eine Zurückhaltung des Proteins in den Plastiden unterbunden ist.

Aufgrund der bisher vorliegenden Daten kann nicht geklärt werden, unter welchen Bedingungen das HvWhy1-Protein an die Motive des *HvS40*-Promotors bindet und ob sich die Bindung zu den einzelnen Motiven unter bestimmten Bedingungen voneinander unterscheidet. Es ist denkbar, dass das HvWhy1-Protein bei Pathogenbefall an das Motiv 2, das die vollständige ERE-ähnliche Sequenz enthält, bindet und damit die Expression des *HvS40*-Gens ermöglicht. Unter diesen Bedingungen könnte die Bindung des HvWhy1-Proteins an das Motiv 1 einen fördernden Effekt auf die Genexpression haben und damit eine zusätzliche Kontrolle der Expression des *HvS40*-Gens sein. In künftigen Arbeiten könnte durch Transaktivierungsversuche in verschiedenen Geweben geprüft werden, ob eine Überexpression des HvWhy1-Proteins zu einer gesteigerten Expression eines Reportergens führt, das unter Kontrolle des Motives 1 oder 2 des *HvS40*-Promotors steht. Entsprechende Untersuchungen wurden verwendet, um zu zeigen, dass bei Pathogenbefall Aktivatoren an W-Boxen binden (Rushton *et al.* 2002).

4.4 Whirly1 als Regulator der Telomerase

Das AtWhy1-Protein wurde nicht nur als Regulator von Abwehrgenen beschrieben, sondern auch als Telomer-Bindeprotein, das den Erhalt der Telomerlänge in *A. thaliana* beeinflusst (Yoo *et al.* 2007). Die Erhaltung der Telomere ist ein essentieller Prozess für die Integrität der Chromosomen. Verkürzen sich die Telomere aufgrund einer geringen Aktivität der Telomerase, so führt dies zum exonucleolytischen Abbau der Chromosomen und letztendlich zur Störung der Zellteilung (Ren *et al.* 2007). Über mehrere Generationen einer AtWhy1-Knockout-Mutante konnte eine erhöhte Aktivität der Telomerase und eine stetige Zunahme der Telomerlänge gezeigt werden (Yoo *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurde für das HvWhy1-Protein gezeigt, dass es sowohl an einzelsträngige Promotorelemente des *HvS40*-Gens der Gerste als auch an Telomersequenzen bindet (s. 3.6.2). Es konnte für das HvWhy1 auch eine geringe Bindung an die RNA, die der Telomerase als Matrize dient, festgestellt werden.

Das HvWhy1-Protein der Gerste scheint ebenso wie das AtWhy1 aus *A. thaliana* mindestens zwei unterschiedliche Funktionen im Zellkern auszuüben. An der Regulation der Telomeraseaktivität sind eine Reihe von Proteinen beteiligt (Zentgraf *et al.* 2000, McKnight *et al.* 2002). So wurde für das „single stranded telomer binding protein 1“ (STEP1) gezeigt, dass das Protein im Zellkern die Aktivität der Telomerase verhindert. Andererseits kodiert das zugehörige Gen *cp31* auch für ein plastidäres RNA-Bindeprotein. Für dieses Gen konnte gezeigt werden, dass es für multiple mRNAs mit unterschiedlichen 5'-Enden kodiert (Cheng *et al.* 1994), deren zugehörige Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle vorliegen und dort unterschiedliche Funktionen haben können (Kwon und Chung 2004).

Das Why1-Protein könnte als Regulator der Telomeraseaktivität fungieren. Unter der Voraussetzung, dass das HvWhy1-Protein der Gerste dieselbe Funktion besitzt wie das AtWhy1, könnte es als negativer Regulator die Aktivität der Telomerase beeinflussen. Es ist zu prüfen, ob die Seneszenz in Gerste durch die Bindung des HvWhy1-Proteins an die Telomere oder die Telomer-RNA beeinflusst ist.

4.5 Subzelluläre Lokalisation der Whirly-Proteine aus *A. thaliana*

Die Whirly-Proteine wurden bisher als Einzelstrang-bindende Transkriptionsfaktoren im Zellkern beschrieben. Das erste untersuchte Whirly-Protein StWhy1 aus Kartoffel wurde durch die Bindung an das ERE-Element des *PR10a*-Promotors isoliert. Yoo *et al.* (2007) beschreiben hingegen AtWhy1 als Regulator der Telomeraseaktivität im Zellkern (s. 4.4). In dieser Arbeit konnten mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen in transienten Ansätzen die Whirly-Proteine AtWhy1 und AtWhy3 aus *A. thaliana* ausschließlich in den Plastiden und AtWhy2 in den Mitochondrien lokalisiert werden. Eine Akkumulation im Cytoplasma und im Zellkern konnte für die Proteine AtWhy1 und

HvWhy1 nach Deletion der plastidären Importsequenz gezeigt werden (s. 3.7.2). In diesem Kapitel werden die möglichen Mechanismen zur intrazellulären Verteilung des Why1-Proteins, diskutiert.

Durch einen Vergleich der Sequenzen von Whirly-Proteinen aus verschiedenen Pflanzenarten lassen sich die Whirly-Proteine in eine Why1-Gruppe mit plastidärer Importsequenz und in eine Why2-Gruppe mit mitochondrialer Importsequenz einteilen (Krause *et al.* 2005). Während alle Pflanzenarten jeweils über ein mitochondriales und ein plastidäres Whirly-Protein verfügen, kommt in *A. thaliana* ein zweites plastidäres Protein (AtWhy3) vor. Die Lokalisation der Proteine in den Plastiden oder Mitochondrien lässt eine Funktion der Proteine in den Organellen vermuten. Das AtWhy1-Protein konnte in Fusion mit GFP in kleinen Aggregaten in den Chloroplasten der Kartoffelprotoplasten nachgewiesen werden. Diese Aggregate lassen eine Lokalisation an den Nukleoiden vermuten und könnten für eine Bindung des AtWhy1-Proteins an die plastidäre DNA sprechen. Allerdings weisen plastidäre Genome keine typischen Bindemotive für Whirly-Proteine auf. Ebenso konnte durch immunhistochemische Analysen gezeigt werden, dass das HvWhy1-Protein in Gerste nicht mit der Plastiden-DNA kolokalisiert (Dr. M. Mulisch, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser Befunde ist eine mögliche Funktion des AtWhy1-Proteins als plastidärer Transkriptionsfaktor eher unwahrscheinlich. Für das AtWhy2-Protein gibt es bisher einen einzigen Hinweis auf eine Funktion als Einzelstrang-bindendes Protein in den Mitochondrien. Mit Hilfe von Affinitäts-Chromatographie gegen einzelsträngige mitochondriale DNA konnte ein Protein aus den Mitochondrien der Kartoffel isoliert werden, das nach N-terminaler Sequenzierung als homologes Protein zum Why2-Protein aus *A. thaliana* identifiziert wurde (Vermel *et al.* 2002).

Da das Whirly1-Protein als Transkriptionsfaktor im Zellkern beschrieben wurde, muss es sowohl in die Plastiden als auch in den Zellkern importiert werden. Der Transport von an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Proteinen in zwei unterschiedliche Kompartimente, der als ‚Dual targeting‘ bezeichnet wird, konnte schon für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beschrieben werden (Silva-Filho 2003, Schwacke *et al.* 2007). Dabei kann die Verteilung der Proteine auf der Ebene der Transkription oder der Translation reguliert werden. Ein Transkript kann differentiell transkribiert, translatiert oder alternativ gespleißt werden. Durch ein *in-vitro*-Translationsexperiment mit cDNA des *AtWhy1*-Gens konnte gezeigt werden, dass zwei Proteine mit geringfügig unterschiedlichem Molekulargewicht entstehen, die auf ein alternatives Startkodon des *AtWhy1*-Gens hinweisen (Krause *et al.* 2005). Ein bekanntes Beispiel ist in diesem Zusammenhang das *cp31*-Gen, das für multiple mRNAs kodiert (Cheng *et al.* 1994). Das längere Transkript kodiert für ein plastidäres RNA-Bindeprotein (CP31), während das kürzere Transkript für das Telomerbindeprotein STEP1 steht, das im Zellkern lokalisiert ist (Kwon und Chung 2004).

Durch Entfernung der Importsequenz für die Plastiden konnte in transienten Ansätzen mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen (Δ PTP-Why1) gezeigt werden, dass die Whirly-Proteine AtWhy1 und

HvWhy1 ohne Importsequenz nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert sind (s. 3.7.2). Da die Δ TP-Why1-Proteine in Fusion mit GFP ein Molekulargewicht von 50 kD besitzen, ist es wahrscheinlich, dass die Proteine die Kernporen allein durch Diffusion überwinden können (Köhler 1998). Desveaux *et al.* (2005) postulieren jedoch eine potentielle NLS in der hoch konservierten basischen Region des sechsten β -Stranges des Why1-Proteins. Aufgrund der Sequenz ist daher sowohl eine Lokalisation in den Plastiden als auch im Zellkern möglich.

Für das AtWhy1-Protein gibt es, abgesehen von dem genannten *in-vitro*-Translationsexperiment, bisher keine Hinweise auf verschiedene Transkripte oder Proteinsequenzen. Geht man davon aus, dass es nur ein Translationsprodukt für das Why1-Protein gibt, das in die Plastiden importiert wird, ist anzunehmen, dass es einen Export aus den Plastiden mit anschließendem Import in den Zellkern gibt. Bisher ist ein entsprechender Mechanismus nicht bekannt. Für das SEBF-Protein, das an den Promotor des *PR10a*-Genes der Kartoffel bindet, scheint eine vergleichbare Situation vorzuliegen. SEBF besitzt eine plastidäre Importsequenz und ist sowohl in den Plastiden als auch im Zellkern nachweisbar (Boyle und Brisson 2001). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte in beiden Kompartimenten nur das reife SEBF-Protein mit identischem Molekulargewicht nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass unter bestimmten Umständen Plastiden abgebaut werden und damit Proteine freisetzen. In späten Phasen der Seneszenz nimmt die Anzahl der Plastiden in den Zellen ab (Krupinska 2006). Durch den Abbau der Plastiden, dessen Mechanismus noch weitestgehend unverstanden ist, können Proteine frei werden, die dann zu einem neuen Bestimmungsort, wie dem Zellkern transportiert werden. Andererseits ist es auch denkbar, dass plastidäre Proteine über die ‚Stromules‘ in andere Teile der Zelle transportiert werden (Kumar *et al.* 2004). ‚Stromules‘ sind Stroma enthaltende tubuläre Ausstülpungen der plastidären Hüllmembran, deren Bildung gewebespezifisch und entwicklungsabhängig reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Plastiden mit ‚Stromules‘ in frühen Entwicklungsstadien um den Zellkern angeordnet sind (Köhler und Hanson 2000) und dabei unter bestimmten Bedingungen eine wichtige Rolle für den Transport von Proteinen zum Kern spielen könnten (Waters *et al.* 2004).

Zum Nachweis eines möglichen *Why1*-Transkriptes aus den Plastiden und dem Zellkern ist zunächst der N-Terminus zu bestimmen. Falls dieser N-Terminus identisch ist, könnte eine Plastidentransformation Hinweise zu einer entwicklungsabhängigen Verteilung des Why1-Proteins geben.

Literaturverzeichnis

- Akashi K., Grandjean O., Small I.** (1998) Potential dual targeting of an *Arabidopsis* archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Letters* 431, 39-44.
- Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishikawa A., Dixon R.A., Lamb C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Becker W. und Apel K.** (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* 189, 74-79.
- Birnboim H.C. und Doly J.** (1979) A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Bogerd H.P., Fridell R.A., Benson R.E., Hua J., Cullen B.R.** (1996) Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukaemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4207-4214.
- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffmann N.E., Davis K.R., Grolach J.** (2001) Growth stage based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13, 1499-1510.
- Boyle B. und Brisson N.** (2001) Repression of the defense gene *PR10a* by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *The Plant Cell* 13, 2525-2537.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Navabpour S., Page T., Park D.** (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology* 1, 3-22.
- Buck M.J. und Atchley W.R.** (2003) Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *Journal of Molecular Evolution* 56, 742-750.
- Butt A., Mousley C., Morris K., Beynon J., Can C.** (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal* 16, 209-221.
- Cao J., Jiang F., Sodmergen, Cui K.** (2003) Time-course of programmed cell death during leaf senescence in *Eucommia ulmoides*. *Journal of Plant Research* 162, 7-12.
- Chen C. und Chen Z.** (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defence response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiology* 129, 706-716.
- Chen E.Y. und Clarke D.M.** (2002) The PEST sequence does not contribute to the stability of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *BMC Biochemistry* 3, 29.
- Chen W., Provart N., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Main B., Heinlein M., Kobayashi K., Hon T., Dangel J.L., Wang X., Zhu T.** (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggest their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14, 559-574.
- Chen Z., Hagler J., Palombella V.J., Melandri F., Scherer D., Ballard D., Maniatis T.** (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Development* 9, 1586-1597.
- Cheng S.H., Cline K., DeLisle A.J.** (1994) An *Arabidopsis* chloroplast RNA-binding protein gene encodes multiple mRNAs with different 5' ends. *Plant Physiology* 106, 303-311.
- Clough S.J. und Bent A.F.** (1998) Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16, 735-743.

- Dähnhardt D.** (2003) Untersuchungen zur Regulation der seneszenzabhängig exprimierten Gene *hpd* und *HvS40* der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und subzelluläre Lokalisierung des HvS40-Proteins. Dissertation, Kiel.
- Dangl J.** (2000) Plant defense. Long view from a high plateau. *Nature* 7, 543-544.
- Dat J.F., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- del Rio L.A., Pastori G.M., Palma J.M., Sandalio L.M., Sevilla F., Corpas F.J., Jiménez A., López-Huertas E., Hernández J.A.** (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116, 1195-1200.
- Després C., Subramaniam R., Matton D.P., Brisson N.** (1995) The activation of the potato *PR10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *The Plant Cell* 7, 589-598.
- Desveaux D., Allard J., Brisson N., Sygusch J.** (2002). A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nature Structural Biology* 9, 512-517.
- Desveaux D., Després C., Joyeux A., Subramaniam R., Brisson, N.** (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in the *PR10a* gene activation in potato. *The Plant Cell* 12, 1477-1489.
- Desveaux D., Maréchal A., Brisson N.** (2005) Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends in Plant Science* 10, 95-102.
- Desveaux D., Subramaniam R., Després C., Mess J.N., Lévesque C., Fobert P.R., Dangl J.L.** (2004) A Whirly transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 6, 229-240.
- Dong X.** (2004) NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 547-552.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 1349.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S., Somssich I.E.** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5, 199-206.
- Falk J., Krauß N., Dähnhardt D., Krupinska K.** (2002) The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase is expressed during oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* 159, 1245-1253.
- Feller U. und Kleist M.** (1986) Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: Lambers H., Neeterson J.J., Stulen I. (Hrsg.), Fundamental ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 219-234.
- Finkelstein R.R. und Lynch T.J.** (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* 12, 599-609.
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J., Scott I.** (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* 116, 1351-1357.
- Gan S.** (1995) Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence. Dissertation, Wisconsin, Madison.
- Gan S. und Amasino R.M.** (1997) Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* 113, 313-319.
- Gepstein S. und Thimann K.V.** (1980) Changes in the abscisic acid content of oat leaves during senescence. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 77, 2050-2053.
- Glazebrook J.** (2005) Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205-227.
- Govrin E.M. und Levine A.** (2002) Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Molecular Biology* 48, 267-276.

- Grabe N.** (2007) Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Whirly-Transkriptionsfaktoren in Höheren Pflanzen. Diplomarbeit, Kiel.
- Grebenok R.J., Lambert G.M., Galbraith D.W.** (1997) Characterization of the nuclear accumulation of GFP within the cells of transgenic plants. *The Plant Journal* 12, 685-696.
- Greenberg J.T.** (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 525-545.
- Guo Y. und Gan S.** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* 46, 601-612.
- Hajouj T., Michelis R., Gepstein S.** (2000) Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology* 124, 1305-1314.
- Hammond-Kosack K.E., Silverman P., Raskin I., Jones J.D.G.** (1996) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* induce changes in cell morphology and the synthesis of ethylene and salicylic acid in tomato plants carrying the corresponding *Cf* disease resistance gene. *Plant Physiology* 110, 1381-1394.
- Han L.Y., Zheng C.J., Lin H.H., Cui J., Li H., Zhang H.L., Tang Z.Q., Chen Y.Z.** (2005) Prediction of functional class of novel plant proteins by a statistical learning method. *New Phytologist* 168, 109-121.
- Harley C.B.** (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research* 256, 271-281.
- Hausmann L. und Toepfer R.** (1999) Entwicklung von Plasmidvektoren, Vorträge für Pflanzenzüchtung Heft 45, Bioengineering für Rapssorten nach Maß. (Hrsg.) Bauer D., Röggelen G., Toepfer R., 155-172, Göttingen.
- Haußühl K.** (1998) Charakterisierung der Blattseneszenz von *Hordeum vulgare* L. unter besonderer Berücksichtigung des Gens *HvS40*. Dissertation, Köln.
- He Y. und Gan S.** (2001) Identical promoter elements are involved in regulation of the *OPR1* gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 47, 595-605.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F., Gan S.** (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* 128, 876-884.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S.** (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* 126, 707-716.
- Hensel G. und Kumlehn J.** (2004) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by co-culture of immature embryos with Agrobacteria. In: Transgenic Crops of the World – Essential Protocols. Curtis, I.S. (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, 35-43.
- Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J., Kumlehn J.** (2007) Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology*, im Druck.
- Himmelblau E. und Amasino R.** (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158, 1317-1323.
- Hinderhofer K. und Zentgraf U.** (2001) Identification of a transcription factor specially expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213, 469-473.
- Hörtensteiner S.** (1999) Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 330-347.
- Horvath H., Rostoks N., Brueggeman R., Steffenson B., von Wettstein D., Kleinhofs A.** (2003) Genetically engineered stem rust resistance in barley using the *Rpg1* gene. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 100, 364-369.
- Hückelhoven R., Fodor J., Trujillo M., Kogel K.H.** (2000) Barley Mla and Rar mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f. sp. hordei are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at the site of fungal invasion. *Planta* 212, 16-24.

- Humbeck K.**, Quast S., Krupinska K. (1996) Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environment* 19, 337-344.
- Hung K.T. und Kao C.H.** (2003) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Journal of Plant Physiology* 160, 871-879.
- Hung K.T. und Kao C.H.** (2004) Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid-induced senescence of rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 161, 1347-1357.
- Jensen M.K.**, Rung J.H., Gregersen P.L., Gjetting T., Fuglsang A.T., Hansen M., Joehnk N., Lyngkjaer M.F., Collinge D.B. (2007) The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 65, 137-150.
- Jin H. und Martin C.** (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology* 41, 577-585.
- Kang H.G. und Singh K.B.** (2000) Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *The Plant Journal* 21, 329-339.
- Kilian A.**, Stiff C., Kleinhofs A. (1995). Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 92, 9555-9559.
- Kim S.Y.**, Ma J., Perret P., Li Z., Thomas T.L. (2002) *Arabidopsis* ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiology* 130, 688-697.
- Kinkema M.**, Fan W., Dong X. (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR*-gene expression. *The Plant Cell* 12, 2339-2350.
- Kleber-Janke T.** (1996) Dunkelinduzierte Seneszenzprozesse in Primärblättern der Gerste (*Hordeum vulgare* L.): ein Modellsystem zur Charakterisierung natürlicher Blattseneszenz. Dissertation, Hamburg.
- Kleber-Janke T. und Krupinska K.** (1997) Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta* 203, 332-240.
- Köhler R.H.** (1998) GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells. *Trends in Plant Science* 3, 317-320.
- Köhler R.H. und Hanson M.R.** (2000) Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *Journal of Cell Science* 113, 81-89.
- Koncz C. und Schell J.** (1986) The promoter of the T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Gene Genetic* 204, 383-396.
- Kong Z.**, Meina L., Yang W., Xu W., Xue Y. (2006) A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiology* 141, 1376-1388.
- Korfhage U.**, Trezzini G.F., Meier I., Hahlbrock K., Somssich I.E. (1994) Plant homeodomain involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* 6, 695-708.
- Krause K.**, Kilbiński I., Mulisch M., Rödiger A., Schäfer A., Krupinska K. (2005) DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Letters* 579, 3707-3712.
- Krupinska K.** (2006) Fate and activities of plastids during leaf senescence. The structure and function of plastids. Wise R.R. und Hooper J.K. (Hrsg.) Springer, 433-449.
- Krupinska K. und Humbeck K.** (2003) Photosynthesis and chloroplast breakdown. In: Noodén N.D. (Hrsg.) *Cell death in plants*. San Diego, Academic Press Inc., 169-187.
- Krupinska K.**, Haußühl K., Schäfer A., van der Kooij T.A., Leckband G., Lörz H., and Falk J. (2002). A novel nucleus targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiology* 130, 1172-1180.
- Kumar S.**, Natesan A., Sullivan J.A., Gray J. (2004). Stromules: a characteristic cell-specific feature of plastid morphology. *Journal of Experimental Botany* 56, 787-797.

- Kurooka H. und Yoshifumi Y.** (2005) Nucleo-cytoplasmic shuttling of Id2, a negative regulator of basic helix-loop-helix transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 4313-4320.
- Kwon C. und Chung I.K.** (2004) Interaction of an *Arabidopsis* RNA-binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 12812-12818.
- Laemmli U.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagrange T., Hakimi M.A., Pontier D., Courtois F., Alcaraz J.P., Grunwald D., Lam E., Lerbs-Mache S.** (2003) Transcription factor IIB (TFIIB)-related proteins (pBrp), a plant specific member of the TFIIB-related protein family. *Molecular and Cellular Biology* 23, 3274-3286.
- Laloi C., Mestres-Ortega D., Marco Y., Meyer Y., Reichheld J.P.** (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its W-box mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* 134, 1006-1016.
- Lamb C. und Dixon R.A.** (1997) The oxidative burst in disease resistance. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275.
- Lazo G.R., Stein P.A., Ludwig R.A.** (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Journal of Biotechnology* 9, 963-967.
- Léon J., Rojo E., Sánchez-Serrano J.J.** (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 354, 1-9.
- Li J., Brader G., Palva E.T.** (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell* 16, 319-331.
- Ligterink W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H., Scheel D.** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defence of plants. *Science* 276, 2054-2057.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G.** (2007) Leaf senescence. *The Annual Review of Plant Biology* 58, 115-136.
- Luo H., Song F., Goodman R.M., Zheng Z.** (2005) Up-regulation of *OsBIHD1*, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biology* 7, 459-468.
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A. Schmid J., Lawton J., Dangi L., Dietrich R.A.** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26, 403-409.
- Matile P. und Hörtensteiner S.** (1999) Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 67-95.
- Mayda E., Tornero P., Conejero V., Vera P.** (1999) A tomato homeobox gene (*HD-zip*) is involved in limiting the spread of programmed cell death. *The Plant Journal* 20, 591-600.
- McKnight T.D., Riha K., Shippen D.E.** (2002) Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome. *Plant Molecular Biology* 48, 331-337.
- Merkle T.** (2001) Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* 213, 499-517.
- Meyer T., Burow M., Bauer M., Papenbrock J.** (2003) *Arabidopsis* sulfurtransferase: investigation of their function during senescence and in cyanide detoxification. *Planta* 217, 1-10.
- Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U.** (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55, 853-867.
- Morris K., Mackerness S.A., Page T., John C.F., Murphy A.M.** (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during senescence. *The Plant Journal* 23, 677-685.
- Nagy J.I. und Maliga P.** (1976) Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Pflanzenphysiologie* 78, 453-455.

- Nakashima K.**, Fujita Y., Katsura K., Maruyama K., Narusaka Y., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including *RD29B* and *RD29A* in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 60, 51-68.
- Nakashima K.**, Kiyosue T., Shinozaki K., Watanabe A. (1997) A nuclear gene encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress also developmentally upregulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 12, 851-861.
- Nam H.G.** (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion of Biotechnology* 8, 200-207.
- Narusaka Y.**, Narusaka M., Seki M., Umezawa T., Ishida J., Nakajima M., Enju A., Shinozaki K. (2004) Crosstalk in the response to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome *P450* gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 55, 327-342.
- Niman H.L.**, Houghten R.A., Walker L.E., Reisfeld R.A., Wilson I.A., Lerner R.A. (1983) Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 80, 4949-4953.
- Noodén L.D.** (1988) The phenomena of senescence and aging. In: Noodén LD, Leopold AC (Hrsg.). Senescence and aging in plants. San Diego, Academic Press.
- Noodén L.D. und Penney J.P.** (2001) Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany* 52, 2151-2159.
- Obregón P.**, Martín R., Sanz A. Castresana C. (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Molecular Biology* 46, 67-77.
- Oh S.A.**, Lee S.Y., Chung I.K., Lee C.H., Nam H.G. (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* 30, 739-754.
- Otegui M.S.**, Noh Y.S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin L.A. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* 41, 831-844.
- Parthier B.** (1990) Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence. *Journal of Plant Growth Regulation* 9, 445-454.
- Pontier D.**, Gan S., Amasino R.M., Roby D., Lam E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology* 39, 1243-1255.
- Quirino B.F.**, Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5, 278-282.
- Quirino B.F.**, Normanly J., Amasino R.M. (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* 40, 267-278.
- Rao M.V. und Davis K.R.** (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *The Plant Journal* 32, 447-456.
- Rechsteiner M. und Rogers S.W.** (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 267-271.
- Ren S.**, Mandadi K.K., Boedeker A.L., Rathore K.S., McKnight T.D. (2007) Regulation of telomerase in *Arabidopsis* by BT2, an apparent target of Telomerase Activator1. *The Plant Cell* 19, 23-31.
- Robatzek S. und Somssich I.E.** (2002) Targets of ATWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Development* 16, 1139-1149.
- Rushton P.J.**, Reinstädler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I.E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound induced signalling. *The Plant Cell* 14, 749-762.

- Ruzinova M.B. und Benezra R.** (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends in Cell Biology* 13, 410-418.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 74, 5463-5467.
- Scharrenberg C.** (2001) Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle der Genexpression während der Blattseneszenz der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Kiel.
- Scharrenberg C., Falk J., Quast S., Haußühl K., Humbeck K, Krupinska K.** (2003) Isolation of senescence-related cDNAs from flag leaves of field grown barley plants. *Physiologia Plantarum* 118, 278-288.
- Schwacke R., Fischer K., Ketelsen B., Krupinska K., Krause K.** (2007) Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Molecular Genetics and Genomics* 277, 631-646.
- Shen Q.J., Casaretto J.A., Zhang P., Ho T.H.D.** (2004) Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* 54, 111-124.
- Shippen D.E. und McKnight T.D.** (1998) Telomeres, telomerase and plant development. *Trends in Plant Science* 3, 126-130.
- Silva-Filho M.C.** (2003) One ticket for multiple destination: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 589-595.
- Simillion C., Vandepoele K., Van Montagu M.C., Zabeau M., Van de Peer Y.** (2002) The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 99, 13627-13632.
- Simpson S.D., Nakashima K., Narusaka Y., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2003) Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark induced senescence. *The Plant Journal* 33, 259-270.
- Singh K.B., Foley R.C., Onate-Sanchez L.** (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 430-436.
- Smart C.M.** (1994) Gene expression during leaf senescence. *Transley Rev* (64) *New Phytologist* 126, 419-448.
- Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M.C., Korzelius J.P., Van Pelt J.A. Mueller M.J., Buchala A.J., Metraux J.P. Brown R., Kazan K., Van Loon L.C., Dong X., Pieterse C.M.J.** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* 15, 760-770.
- Stödt A.** (2001) Pflanzenregeneration aus Protoplasten von Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und genetische Transformation des homologen seneszenzassoziierten Gens *HvS40*. Dissertation, Hamburg.
- Takahashi Y., Berberich T., Yamashita K., Uehara Y., Miyazaki A., Kusano T.** (2004) Identification of tobacco *HIN1* and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the tobacco mosaic virus-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. *Plant Molecular Biology* 54, 613-622.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Thomas R.J. und Stoddart J.L.** (1980) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 83-111.

- Thomma B.P.H.J.**, Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct pathogens. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 95, 15107-15111.
- Thompson J.D.**, Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Thompson J.E.**, Froese C.D., Madey E., Smith M.D., Hong Y. (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* 37, 119-141.
- Thomson W.W. und Plat-Aloia K.A.** (1987) Ultrastructure and senescence in plants. In Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology, (Hrsg.) Thomson W.W., Nothnagai E.A., Huffaker R.C., Rockville: *American Society of Plant Physiology*, 20-30.
- Tingay S.**, McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* 11, 1369-1376.
- Turner J.G.**, Ellis C., Devoto A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, Supplement 14, S153-S164.
- Uauy C.**, Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. (2006) A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314, 1298-1301.
- Uknes S.**, Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E., Ryals J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 4, 645-656.
- Ülker B. und Somssich I.E.** (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 491-498.
- Urao T.**, Yamaguchi-Shinozaki K., Urao S., Shinozaki K. (1993) An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell* 5, 1529-1539.
- Van der Graaff E.**, Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Fluegge U.I., Kunze R. (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* 141, 776-792.
- Vermel M.**, Guermann B., Delage L., Grienemberger J.M., Marechal-Drouard L., Gualberto J.M. (2002) A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 99, 5866-5871.
- Vision T.J.**, Brown D.G., Tanksley S.D. (2000) The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* 290, 2114-2117.
- Waters M.T.**, Fray R.G., Pyke K.A. (2004) Stromule formation is dependent upon plastid size, plastid differentiation status and the density of plastids within the cell. *The Plant Journal* 39, 655-667.
- Weaver L.M. und Amasino R.M.** (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* 127, 876-886.
- Weaver L.M.**, Gan S., Quirino B., Amasino R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37, 455-469.
- Wedemeyer N.** (2005) Untersuchungen zur Expression des *HvS40*-Gens in Samen der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit, Kiel.
- Woodcock D.M.**, Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* 17, 3469-3478.
- Wu C.Y.**, Washida H., Onodera Y., Harada K., Takaiwa F. (2000) Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *The Plant Journal* 23, 415-421.
- Xie D.X.**, Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J.G. (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defence and fertility. *Science* 280, 1091-1094.

-
- Yen C.H. und Yang C.H.** (1998) Evidence of programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiology* 39, 922-927.
- Yoo H.H.**, Kwon C., Lee M.M., Chung I.K. (2007) Single-stranded DNA binding factor AtWhy1 modulates telomere length homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49, 442-451.
- Yoshida S.** (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 79-84.
- Zentgraf U.**, Hinderhofer K., Kolb D. (2000) Specific association of a small protein with the telomeric DNA-protein complex during the onset of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 42, 429-438.
- Zheng Z.**, Mosher S.L., Fan B., Klessig D.F., Chen Z. (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defence against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biology*, im Druck.
- Zimmermann P. und Zentgraf U.** (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10, 515-534.

A. Anhang

A.1 Proteine der DUF584-Familie

Tab. 10 Auflistung der Proteine der DUF584-Familie, die im Stammbaum (3.1.4, Abb. 9) aufgeführt sind. Angegeben sind die Pflanzenart sowie die Molekulargewichte des jeweiligen Proteins.

Locus/Protein	Pflanze	MG [kD]
Gruppe I		
HvS40	Gerste	15,4
At2g34340	Arabidopsis	15,3
At1g29640	Arabidopsis	16,0
At5g45630	Arabidopsis	13,4
At4g18980	Arabidopsis	12,5
Os_EAY98793	Reis	15,7
Os_EAY98717	Reis	14,4
Os_NP001044239	Reis	15,7
Os_EAY98792	Reis	16,5
Os_EAY75686	Reis	14,4
Zm_AW289154	Mais	13,4
Ta_BF473337	Weizen	14,6
Mb_ABF70130	Banane	13,4
Gruppe II		
At4g04630	Arabidopsis	18,7
At4g21970	Arabidopsis	20,2
At4g26950	Arabidopsis	16,6
Mt_ABE91657	Luzerne	22,2
Gruppe III		
At2g28400	Arabidopsis	18,0
At5g60680	Arabidopsis	18,2
At3g45210	Arabidopsis	16,7
At5g03230	Arabidopsis	19,0
Os_EAY86776	Reis	18,8
Os_NP001053333	Reis	19,3
Mt_ABD32800	Luzerne	17,7
Mt_ABE80969	Luzerne	17,3
Vv_CAN74756	Wein	31,2
Vv_CAN61164	Wein	18,5
Vv_CAN66257	Wein	18,1
Gruppe IV		
At1g11700	Arabidopsis	21,7
At1g61930	Arabidopsis	22,2
At4g21930	Arabidopsis	20,3
Gruppe V		
At3g15040	Arabidopsis	25,5
Hordeum2	Gerste	14,3
Os_NP001064875	Reis	19,6
Os_EAY95021	Reis	23,2
Os_EAZ25341	Reis	15,1
Os_BAD81431	Reis	18,2
Os_NP001066195	Reis	18,3
Os_EAZ14237	Reis	24,3
Os_NP001052750	Reis	27,2
Ta_BE419344	Weizen	17,7
Vv_CAN77892	Wein	22,8
Vv_CAN79276	Wein	24,2
Vv_CAN76322	Wein	23,4

A.2 Untersuchungen zur Expression der sieben DUF584-Gene aus *A. thaliana*

A.2.1 Tabellarische Zusammenfassung

Tab. 11 Tabellarische Zusammenfassung zur Expression der sieben untersuchten Gene der DUF584-Familie aus *A. thaliana*. ↑ = hochreguliert, ↓ = runterreguliert, - = unveränderte Expression.

Gene Locus	Natürliche Seneszenz	Dunkel-induzierte Seneszenz	100µM ABA	100µM MeJa	4mM SA	<i>P. syringae</i> DC3000	<i>B. cinerea</i>
<i>At1g29640</i> <i>AtS40-1</i>	↑	↑	-	-	-	↑	-
<i>At5g45630</i> <i>AtS40-2</i>	↑	↑	↑	-	↑	↑	-
<i>At4g18980</i> <i>AtS40-3</i>	↑	↑	↑	-	↑	↑	-
<i>At2g28400</i> <i>AtS40-4</i>	↑	↑	↑	-	↑	↑	-
<i>At1g11700</i>	↑	(↑)	-	-	-	↓	↓
<i>At1g61930</i>	↑	↓	-	-	-	-	-
<i>At3g15040</i>	↑	-	-	-	-	↑	↓

A.2.2 Inkubation mit Phytohormonen

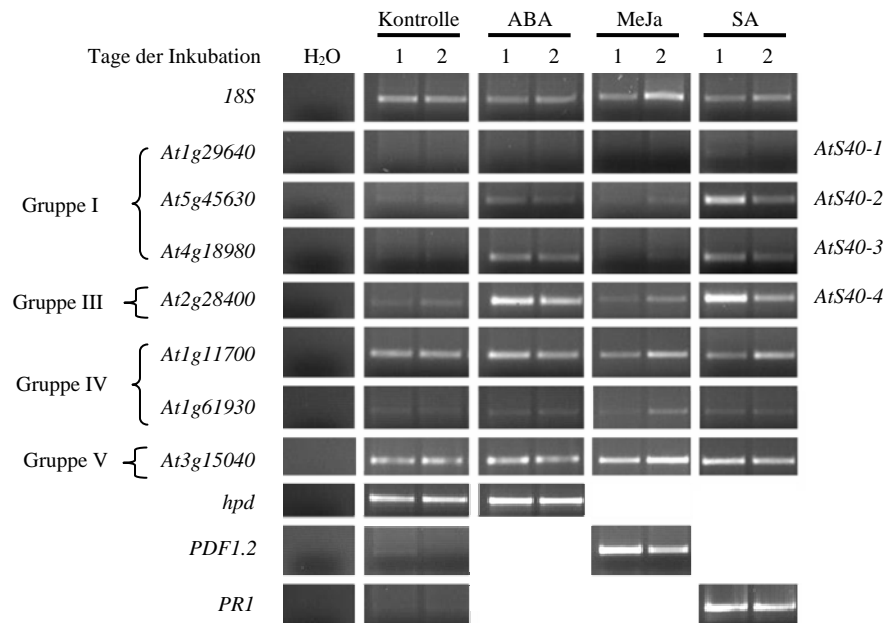


Abb. 40 Einfluss von Phytohormonbehandlungen auf die Genexpression einzelner Mitglieder der DUF584-Familie von *A. thaliana*. Fünf Wochen alte Pflanzen wurden jeweils mit 100 µM Hormonlösungen von ABA und MeJa und einer 4 mM SA-Lösung besprüht und für 1 und 2 Tage inkubiert. Als Kontrolle diente Leitungswasser. Aus je 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relative Transkriptmenge durch RT-PCR quantifiziert. Für die Beladung wurde das 18S-Transkript verwendet. Um den Effekt der Inkubation zu überprüfen, wurden die Transkripte der folgenden Gene nachgewiesen: ABA = *hpd*, MeJa = *PDF1.2*, SA = *PRI*, H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

A.2.3 Pathogeninfektion

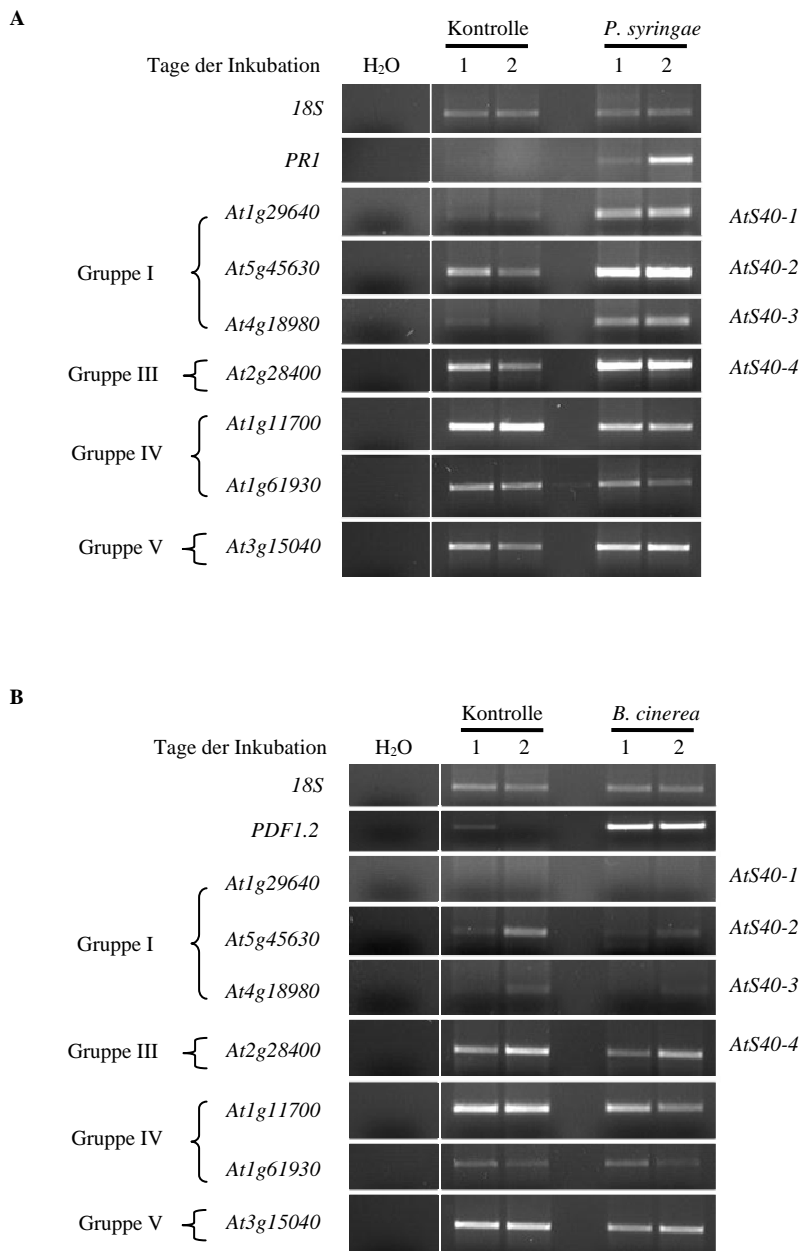


Abb. 41 Einfluss von Pathogenbefall auf die Expression der DUF584-Gene in *A. thaliana*. Pflanzen wurden mit dem Erreger infiziert und für 1 und 2 Tage kokultiviert. Als Kontrolle diente nicht infiziertes Material, das mit Erregermedium behandelt wurde. Aus je 2 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und die relative Transkriptmenge durch RT-PCR quantifiziert. **(A)** Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. **(B)** Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*. Als Kontrollen für die erfolgreiche Infektion wurden das *PR1*- und das *PDF1.2*-Transkript amplifiziert. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des *18S*-Transkripts. H₂O = Wasserkontrolle des PCR-Ansatzes ohne Zugabe von cDNA.

A.2.4 Subzelluläre Lokalisation

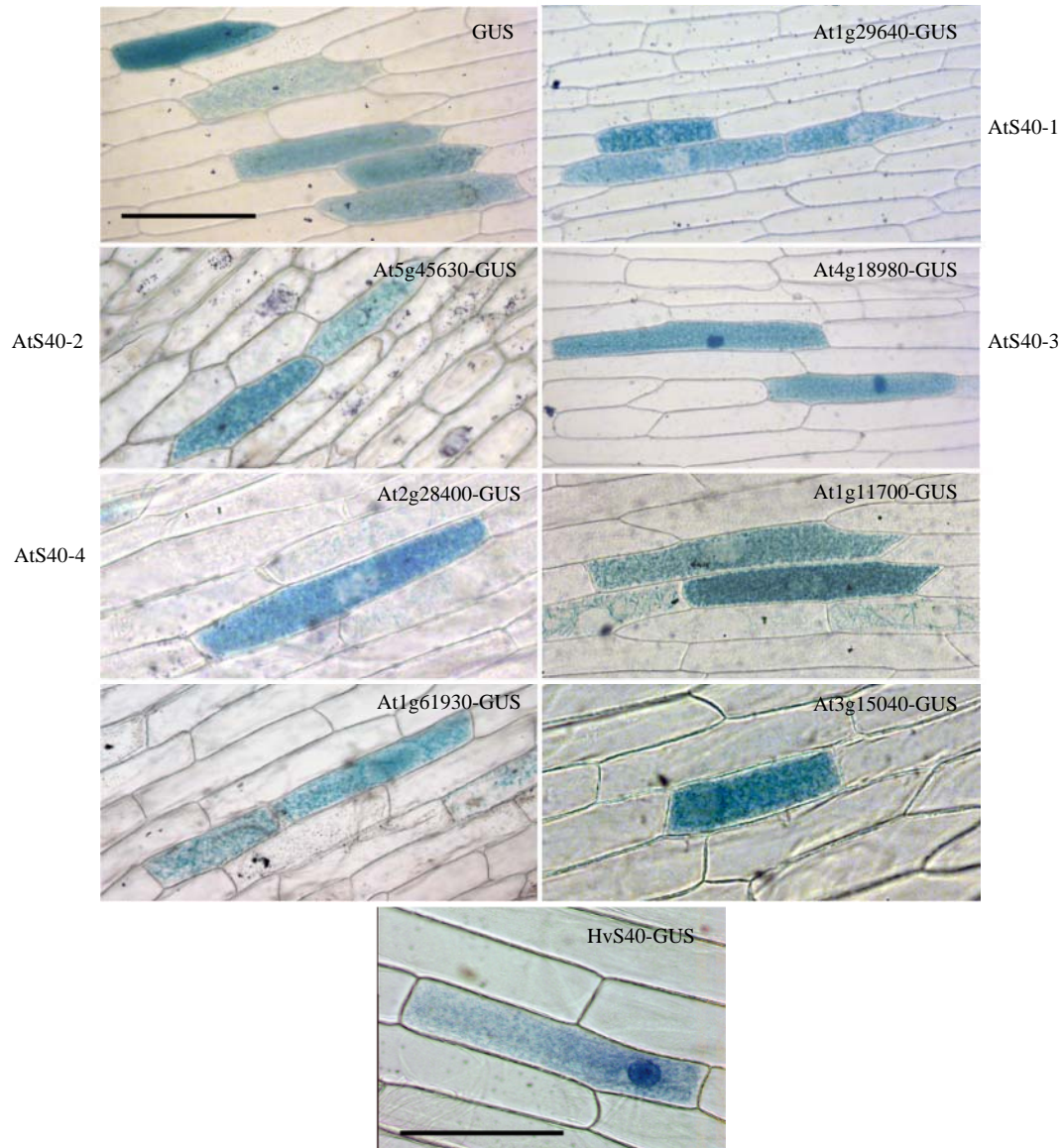


Abb. 42 Subzelluläre Lokalisation der DUF584-Proteine in Fusion mit GUS nach biolistischer Transformation von Zwiebelepidermiszellen. Als Referenz wurde das *HvS40-GUS*-Fusionskonstrukt verwendet (Krupinska *et al.* 2002). Der Nachweis erfolgte 24 h nach der Transformation durch eine GUS-Färbung. Der angegebene Maßstab entspricht 100 µm.

Danksagung

Ich bedanke mich an erster Stelle bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft. Die langjährige Unterstützung meiner Arbeit weiß ich zu schätzen. Ich habe mich bei ihr durchgängig gut aufgehoben gefühlt.

Mein Dank gilt auch den Postdocs Jon, Kirsten und Ying, die immer bereit waren mit mir über theoretische oder praktische Fragen zu diskutieren. Ich bedanke mich auch bei Frau Dr. Maria Mulisch für die gute Zusammenarbeit am CLSM. Die Arbeit dort hat mir viel Spaß gemacht.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Anke, Annekatrin, Susanne und Ulrike für die gute Zusammenarbeit im Labor. Ich finde, wir waren ein super Team. Bei Andrea und Petra bedanke ich mich herzlich für ihren regen Einsatz, um finanzielle Angelegenheiten schnell zu klären.

Für anregende Gespräche an der Laborbank und am Küchentisch danke ich Evelyn. Sie ist nicht nur eine tolle Kollegin, sondern auch eine gute Freundin geworden. Herr Dr. Mario Brosch war für mich der beste männliche Kollege, mit dem man fachliche Fragen sowie private Angelegenheiten in einer gemütlichen Runde klären konnte. Vielen lieben Dank.

Außerdem danke ich Joanna, Kathleen, Sascha und allen weiteren Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe Krupinska sowie allen Arbeitsgruppen des Botanischen Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meine Freundin Silke, die mit mir die gesamte Studienzeit verbracht hat, ist mir im letzten Jahr sehr ans Herz gewachsen. Danke, dass du mit mir sowohl Frust als auch Freude geteilt hast.

Schließlich möchte ich ganz herzlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für die vielen Jahre der Unterstützung danken. Meine Eltern waren immer für mich da und haben sich stets für meine „Forschung“ interessiert.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Guido, der mir mit seiner beruhigenden und liebevollen Art etappenweise zu neuer Energie verhelfen musste. Ohne seine Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit für mich nicht denkbar gewesen. Unsere Familien haben mir des Öfteren zu unbeschwerten Stunden verholfen, die mich so manchen Frust des Labors vergessen ließen.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen

Kilbienski I. und Krupinska K. (2004) The nuclear protein HvS40 - a putative cell death suppressor during leaf senescence and grain development in barley. *Satelliten-Meeting zur Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig.*

Kilbienski I., Wedemeyer N., Mulisch M., Dähnhardt D., Schäfer A., Krupinska K. (2004) The nuclear protein HvS40 - a putative cell death suppressor during leaf senescence and grain development in barley. *Gordon Research Conference of Plant Senescence and Programmed Cell Death, South Hadley, USA.*

Kilbienski I. und Krupinska K. (2006) Charakterisierung einer neuen Genfamilie in *Arabidopsis* und ihrer Expression während der Blattseneszenz. *19. Tagung zur Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.*

Kilbienski I. und Krupinska K. (2007) Characterization of senescence associated members of a new family in *Arabidopsis thaliana*. *Third European Workshop on Plant Senescence, Salza.*

Kilbienski I., Grabowski E., Krupinska K. (2007) The senescence marker gene *HvS40* is regulated by the Whirly1 transcription factor. *Genetics of Aging, Jena.*

Lebenslauf

Isabell Kilbienski

Persönliche Daten

Geburtsdatum	25. November 1975
Geburtsort	Elmshorn
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1982 - 1986	Grund- und Hauptschule, Krempe
1986 - 1995	Auguste-Victoria Gymnasium, Itzehoe
Juni 1995	Abitur erhalten

Berufsausbildung

1995 - 1997	Gärtnerin mit Abschluss, Kölln-Reisiek
-------------	--

Studium

1997 - 2002	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (10 Semester)
Dezember 2002	Abschluss des Studiums, Hauptfach: Zellbiologie Nebenfächer: Botanik, Phytopathologie Diplomarbeit im Fach Zellbiologie unter Betreuung von Prof. Dr. K. Krupinska
seit März 2003	Arbeiten zur Promotion im Fach Zellbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Betreuung von Prof. Dr. K. Krupinska

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt.

Diese Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile der Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Krause K., Kilbiński I., Mulisch M., Rödiger A., Schäfer A., Krupinska K. (2005) DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Letters* 579, 3707-3712.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/ Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

Isabell Kilbiński